

**Untersuchungen zur Regulation der Biosynthese  
der aromatischen Aminosäuren  
von Euglena, Blau- und Grünalgen**

Hermann L. Weber

---

Juni 1970

---



Untersuchungen zur Regulation der Biosyn-  
these der aromatischen Aminosäuren von  
Euglena, Blau- und Grünalgen

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Ludwig Maximilians-Universität

München

vorgelegt

von

Hermann L. Weber

aus

Karlsfeld

---

Juni 1970



1. Berichterstatter: Doz.Dr.A.Böck

2. Berichterstatter: Prof.Dr.O.Kandler

Tag der mündlichen Prüfung: 8. Juli 1970

### Verwendete Abkürzungen

|                   |                                                 |
|-------------------|-------------------------------------------------|
| AMP               | Adenosin-5'- Monophosphat                       |
| ADP               | Adenosin-5'- Diphosphat                         |
| ATP               | Adenosin-5'-Triphosphat                         |
| CoA               | Coenzym A                                       |
| DAHPh             | 3-Deoxy-D-Arabino-Heptulosansäure-7-Phosphat    |
| DEAE              | Diäthylaminoäthyl                               |
| E-4-P             | Erythrose-4-Phosphat                            |
| G-6-P             | Glucose-6-Phosphat                              |
| NAD <sup>+</sup>  | Nicotinamid-adenin-dinucleotid                  |
| NADH              | Nicotinamid-adenin-dinucleotid, reduz.          |
| NADP <sup>+</sup> | Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat         |
| NADPH             | Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat, reduz. |
| pCMB              | p-Chloromercuribenzoat                          |
| PEP               | Phosphoenolpyruvat                              |
| SDS               | Dodecylsulfat, Na-Salz                          |
| TCE               | Trichloressigsäure                              |
| Tris              | Tris (-hydroxylmethyl) -aminomethan             |
| tRNS              | Transferribonucleinsäure                        |
| TMED              | N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin              |

INHALT

|                                                                               | Seite |
|-------------------------------------------------------------------------------|-------|
| I. EINLEITUNG                                                                 | 1     |
| a) Konzertierte Feedbackhemmung                                               | 2     |
| b) Kooperative Feedbackhemmung                                                | 2     |
| c) Kummulative Feedbackhemmung                                                | 4     |
| d) Kompensationsumkehr einer Endprodukthemmung                                | 4     |
| e) Hemmung durch Zwischenprodukte verzweigter Biosynthesewege                 | 4     |
| f) Multiple Enzyme mit spezifischen Regulations-effektoren                    | 4     |
| II. MATERIAL UND METHODEN                                                     | 7     |
| 1. Organismen und Medien                                                      | 7     |
| 2. Anzuchten                                                                  | 9     |
| 3. Extraktbereitung                                                           | 9     |
| a) Durch Beschallen                                                           | 9     |
| b) Durch Pottern und Beschallen                                               | 10    |
| 4. Einbau von C <sup>14</sup> -Aminosäuren                                    | 10    |
| 5. Herstellung und Isolierung von Aminosäuremangelmutanten von Ankistrodesmus | 11    |
| 6. Enzymteste                                                                 | 12    |
| a) DAHP-Synthetase Test                                                       | 12    |
| b) Anreicherung der DAHP-Synthetase                                           | 12    |
| c) Chorismat Mutase                                                           | 12    |
| d) Anthranilat Synthetase                                                     | 13    |
| e) und f) Prephenat-Dehydrogenase und Prephenat-Dehydratase                   | 14    |
| g) Amino-Acyl-tRNS-Synthetasen                                                | 14    |

|                                                           | Seite |
|-----------------------------------------------------------|-------|
| h) Fumerase                                               | 14    |
| i) Laktatdehydrogenase                                    | 14    |
| 7. Herstellung der Substrate der enzymatischen Reaktionen | 14    |
| a) Erythrose-4-phosphat                                   | 14    |
| b) Barium Chorismat                                       | 15    |
| c) Barium Prephenat                                       | 15    |
| d) tRNS                                                   | 16    |
| 8. Reinigung der Chorismat Mutase                         | 17    |
| a) Extraktbereitung                                       | 17    |
| b) Zentrifugation                                         | 17    |
| c) Protaminsulfatfällung                                  | 17    |
| d) Ammonsulfatfällung                                     | 19    |
| e) Ad- und Desorption an Calciumphosphatgel               | 20    |
| f) Chromatographie auf Hydroxylapatit $p_h$ 7,5           | 20    |
| g) Chromatographie auf Hydroxylapatit $p_h$ 7,1           | 21    |
| h) Chromatographie auf Hydroxylapatit $p_h$ 7,8 - 7,0     | 21    |
| i) Einengen auf Hydroxylapatit $p_h$ 7,5                  | 21    |
| k) Chromatographie auf G 200 Sephadex Gel                 | 21    |
| 9. Physikalische und biochemische Methoden                | 22    |
| a) Gradientenzentrifugation                               | 22    |
| b) Molekulargewichtsbestimmung durch Gel-filtration       | 22    |
| c) Elektrophoresen                                        | 22    |
| ca) Polyacrylamidgelelektrophorese                        | 22    |
| cb) Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamidgel Elektrophorese | 23    |
| cc) Präparative Elektrophorese                            | 24    |

|                                                                                       | Seite |
|---------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 10. Weitere kolorimetrische und optische Bestimmungen                                 | 25    |
| a) p-Hydroxyphenylpyruvat                                                             | 25    |
| b) Proteinbestimmung                                                                  | 25    |
| ba) durch Fällern mit TCE                                                             | 25    |
| bb) mit Folin Phenol Reagenz                                                          | 25    |
| bc) durch Absorptionsmessung bei 215 - 225 mμ                                         | 25    |
| 11. Chemikalien                                                                       | 25    |
| III. RESULTATE                                                                        | 26    |
| 1. Vergleich der Regulation der Enzymaktivität im Aromatensyntheseweg                 | 26    |
| A. SYNTHESSEWEG                                                                       | 26    |
| a) Biosynthesegrundzweig                                                              | 27    |
| b) Biosyntheseweg zum Tryptophan                                                      | 28    |
| c) Biosynthese zum Phenylalanin und Tyrosin                                           | 29    |
| B. SCHLÜSSELENZYME                                                                    | 29    |
| a) DAHP-Synthetase                                                                    | 29    |
| aa) Testbedingungen bei Blau- und Grünalgen                                           | 30    |
| ab) Wirkung von Effektoren bei Blaualgen                                              | 32    |
| ac) Nähere Charakterisierung des Enzyms von Anacystis und Anabaena                    | 34    |
| ad) Wirkung von Effektoren bei Ankistrodesmus und Maesotaenium (Grünalgen)            | 37    |
| ae) Wirkung von Effektoren bei Euglena                                                | 37    |
| af) Versuch zur Trennung der DAHP-Synthetase von Euglena nach Ladung und Molekülgröße | 40    |
| ag) Untersuchungen zur Repression                                                     | 40    |
| ah) Aminosäuremangelmutanten von Ankistrodesmus                                       | 41    |

|                                                                                                                        |             |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| ai) Versuche zur in vivo Regulation                                                                                    | Seite<br>41 |
| b) Chorismat-Mutase                                                                                                    | 42          |
| ba) Wirkung der Effektoren auf die Chorismat-Mutase Aktivität bei Grünalgen und Euglena                                | 42          |
| bb) Kompensation der Hemmeffekte durch Tryptophan                                                                      | 44          |
| bc) Wirkung der Effektoren auf die Enzymaktivität bei Anacystis                                                        | 49          |
| c) Anthranilat-Synthetase                                                                                              | 49          |
| 2. Reinigung der Chorismat-Mutase aus Euglena gracilis                                                                 | 51          |
| A. REINIGUNGSVERSUCHE BEI ANDEREN ORGANISMEN                                                                           | 51          |
| B. REINIGUNG DES ENZYMS VON EUGLENA                                                                                    | 52          |
| C. NACHWEIS AUF ISOZYME DURCH ELEKTROPHORESE                                                                           | 54          |
| 3. Allosterische Eigenschaften der Chorismat-Mutase von Euglena gracilis                                               | 57          |
| A. WIRKUNG DER HEMMER                                                                                                  | 57          |
| B. WIRKUNG DES AKTIVATORS                                                                                              | 58          |
| C. WIRKUNG VON pCMB UND 2-MERCAPTOÄTHANOL                                                                              | 59          |
| D. WIRKUNG VON PREPHENAT                                                                                               | 60          |
| E. WIRKUNG DER WASSERSTOFFIONENKONZENTRATION AUF DIE EIGENSCHAFTEN UND AKTIVITÄT DES ENZYMS                            | 60          |
| 4. Enzymkinetik                                                                                                        | 64          |
| A. SUBSTRATBEZIEHUNG BEI $p_h$ 8,4                                                                                     | 65          |
| B. SUBSTRATBEZIEHUNG BEI $p_h$ 7,0                                                                                     | 69          |
| C. ZWISCHENWIRKUNG DER HEMMERBINDUNGSORTE                                                                              | 73          |
| 5. Bestimmung der Größe der Chorismat Mutase mit Dichtegradientenzentrifugation und Sephadex Gel G 200 Chromatographie | 75          |

|                                                                                                  |             |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| 6. Versuche zur Untereinheitenstruktur                                                           | Seite<br>77 |
| IV. DISKUSSION                                                                                   | 80          |
| 1. Kinetik und $p_H$ -Abhängigkeit der Chorismat-Mutase                                          | 80          |
| 2. Struktur des Enzyms                                                                           | 85          |
| 3. Vergleich der Chorismat Mutase von Euglena mit<br>der anderer Organismen                      | 87          |
| 4. Regulation der Biosynthese der aromatischen Amino-<br>säuren bei Euglena, Blau- und Grünalgen | 92          |
| V. ZUSAMMENFASSUNG                                                                               | 95          |
| VI. LITERATURVERZEICHNIS                                                                         | 98          |

## I. EINLEITUNG

Es gibt in biologischen Systemen zwei fundamentale Mechanismen, um den Kohlenstofffluß in Stoffwechselwegen zu kontrollieren: es sind dies die Repression der Enzymsynthese und die Endprodukthemmung der Enzymaktivität. Der Mechanismus der Repression vermindert die Syntheserate eines Enzyms, so daß bei Teilung der Zelle dieses Enzym (-system) nach und nach ausverdünnt wird; im Vorgang der Endprodukthemmung wird bei Überschreiten einer gewissen Konzentration eines oder mehrerer Produkte des betreffenden Biosynthesewegs die Aktivität eines oder mehrerer Enzyme vermindert. Häufig liegen in Bakterien und auch Pilzen beide Systeme kombiniert vor. In einem unverzweigten Biosyntheseweg erscheint das erste Enzym am besten geeignet, die Regulationskontrolle zu übernehmen. Dieser eine Kontrollort genügt, um dem Organismus eine den physiologischen Ansprüchen adäquate Synthese des Endprodukts zu sichern.

Experimentelle Befunde, nach denen man ein gesichertes Modell über die Sequenz DNS - - RNS - - Protein entwerfen kann und das eine Aussage über den Wirkungsort der Repression bzw. Derepression erlaubt, liegen bisher nur für wenige Bakteriensysteme vor. Umbarger (1968) fordert, daß solche Modelle nur jene Komponenten beinhalten sollten, für die sowohl genetische wie physiologische Evidenzen vorliegen. Brauchbare Modelle, die die Regulation der Enzymsynthese auf der Basis der Genfunktion erklären, werden nach dem gleichen Autor solange nicht in diploiden Systemen möglich sein, als kein enzymbildendes System entwickelt wird. Der Mechanismus der Regulation der Enzymsynthese (Repression, Derepression) läßt sich deshalb aus dem Bakteriensystem nicht unverändert auf das Tier- oder Pflanzensystem übertragen.

In einem verzweigten Biosyntheseweg, in dem sich nach einer Reihe gemeinsamer enzymatischer Reaktionen der Syntheseweg zu verschiedenen Endprodukten aufteilt, ist die Regulation

der Synthese als auch der Aktivität von Enzymen wesentlich komplexer. Sie hängt von der Natur der biochemischen Reaktionen, dem Ausmaß der Verzweigung wie auch den physiologischen Anforderungen des betreffenden Organismus ab. Bei vergleichenden Untersuchungen, vor allem an Bakterien, stellte sich heraus, daß zwischen verschiedenen Arten im gleichen Biosyntheseweg in der Regel häufiger verschiedene als gleiche Regulationsmuster vorkommen. Berücksichtigt man die genetischen und metabolischen Unterschiede, dann sind diese Befunde nicht überraschend. Auch an Hefe-, Tier- und Pflanzenzellen wurde die Regulation von Enzymaktivitäten studiert. Prinzipiell scheinen sich die regulatorischen Proteine von Eukaryonten und Prokaryonten nicht mehr zu unterscheiden, als die verschiedener Prokaryonten.

#### a) Konzertierte Feedbackhemmung

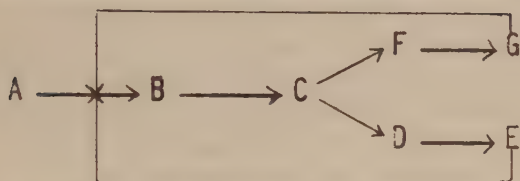
Eine erhebliche Erweiterung des Musters der einfachen Endprodukthemmung eines unverzweigten Biosynthesewegs stellt die multivalente Endprodukthemmung eines mehrfunktionellen Biosynthesewegs dar. Paulus und Gray (1964) und Datta und Gest (1964) fanden in der Aspartokinase von *Bacillus polymyxa* und *Rhodopseudomonas capsulatus* ein solches Regulationsmuster, das sie als konzertierte Feedbackhemmung bezeichneten (Abb. 1a). Weder die Aminosäure Lysin noch Threonin allein haben irgend eine Wirkung auf die Aktivität der Aspartokinase, beide zusammen wirken hemmend.

#### b) Kooperative Feedbackhemmung

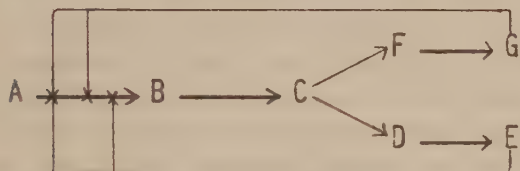
Einen ähnlichen Mechanismus stellt die kooperative Endprodukthemmung dar. Sie tritt bei einfach verzweigten Biosynthesewegen auf (Abb. 1b). Ein Endprodukt jeweils allein hemmt das Anfangsenzym des gemeinsamen Biosynthesewegs nur gering, während beide zusammen eine größere Hemmung bewirken als die Summe der beiden Hemmeffekte ausmacht. Das erste Enzym der Purin-Nukleotid-Biosynthese (Caskey et al. 1966) und ebenso die Lysin spezifische Aspartokinase von *E. coli* (Lee et al. 1966) werden nach diesem Muster gehemmt.

$\Longrightarrow$  Aktivierung       $\longrightarrow \times$  Hemmung

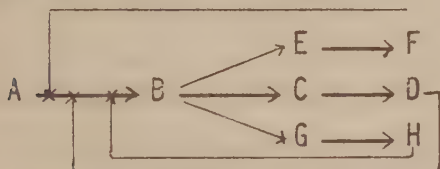
### a. Konzertierte Feedbackhemmung



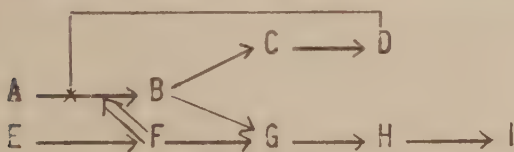
### b. Kooperative Feedbackhemmung



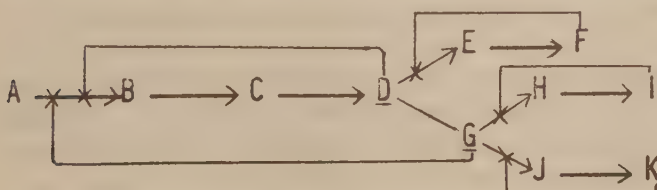
### c. Kummulative Feedbackhemmung



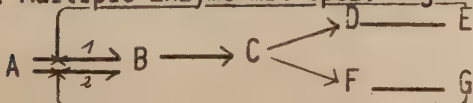
### d. Kompensationsumkehr der Feedbackhemmung



### e. Zwischenprodukthemmung (sequentielle Hemmung)



### f. Multiple Enzyme mit spez. Regulationseffektoren



### c) Kummulative Feedbackhemmung

Woolfolk und Stadtman (1967) fanden bei der Glutamin-Synthetase eine neue Art multipler Endproduktkontrolle. Jedes von mehreren Endprodukten hemmt für sich spezifisch zu einem gewissen Prozentsatz, ohne Rücksicht ob andere Inhibitoren vorhanden sind oder nicht. Es findet weder ein Zusammen- noch ein Gegeneinanderwirken, weder bei der Bindung des Hemmers noch in der Hemmwirkung von einem Hemmer auf einen anderen statt.

### d) Kompensationsumkehr einer Endprodukthemmung

Führt ein verzweigter Biosyntheseweg zu sehr verschiedenen Endprodukten, die z. B. einerseits an der Protein- andererseits an der Purinsynthese beteiligt sind, so können die Anforderungen des Organismus an die entsprechenden Endprodukte unter Umständen sehr unterschiedlich sein. Pierard (1966) fand, daß Uridylsäure die Carbamyl-Phosphat-Synthetase von E.coli fast vollständig hemmt, während in Gegenwart von Ornithin das Enzym nur zu 60 % hemmbar ist (Abb. 1d).

### e) Hemmung durch Zwischenprodukte verzweigter Biosynthesewege

Vergleichende Studien an verschiedenen Organismen zeigten, daß nicht immer nur das Endprodukt regulatorisch auf das Anfangsenzym wirken kann. Nester und Jensen (1966) fanden im Biosyntheseweg der aromatischen Aminosäuren, daß zwei Zwischenprodukte an Verzweigungsstellen, nämlich Chorismat und Prephenat, das erste Enzym, die DAHP-Synthetase, hemmen, während Prephenat-Dehydrogenase durch das Endprodukt Tyrosin und Prephenat-Dehydratase durch das Endprodukt Phenylalanin gehemmt werden (sequentielle Hemmung Abb. 1e).

### f) Multiple Enzyme mit spezifischen Regulationseffektoren

Die erste enzymatische Reaktion in der Aspartat-Familie der Aminosäuren, nämlich die Umwandlung des Aspartats zu seinem  $\beta$ -Acyl-Phosphat-Derivat wird bei E.coli durch drei verschiedene Enzyme katalysiert. Zwei davon sind endprodukthemmbar,

nämlich eines durch Lysin, das andere durch Threonin (Abb. 1f), durch beide Endprodukte ist die entsprechende Enzymsynthese auch reprimierbar; die dritte Aspartokinase ist durch Methionin reprimierbar.

Den unter a) - f) kurz dargelegten Regulationsmustern ist gemeinsam, daß die Kontrolle der Enzymaktivität durch Effektoren erfolgt, die in nicht-kovalenter Bindung am Enzym vorliegen. Es gelang Holzer (1966) und Stadtman (1967) der Nachweis, daß in einigen Enzymsystemen der gleiche Effekt durch kovalente Bindung von Effektoren erreicht werden kann. Der raschen In- und Reaktivierung der Glutamin-Synthetase liegt ein solcher Mechanismus zugrunde. Beide Enzymformen sind enzymatisch aktiv, jedoch sind die Bedingungen, bei denen eine Regulation stattfindet, bei beiden Formen sehr verschieden. In ähnlicher Weise werden auch die Malat-Dehydrogenase und die Fruktosediphosphat-Phosphatase bei Hefen inaktiviert.

Die Regulation der Enzymaktivitäten vieler Biosynthesewege wurde bisher weitgehend nur an heterotrophen Organismen oder Zellkulturen untersucht. Der Vorteil dieser Organismen, durch Aufnahme von Vorstufen (Aminosäuren, Purin- und Pyrimidinbasen) den entsprechenden internen Pool aufzufüllen und bei genügend hoher Konzentration die Biosynthese dieser Vorstufen einzustellen entfällt zumindest theoretisch für die autotrophen Organismen, wenn sie in natürlicher Umgebung, d. h. in einem kaum supplementierten Salzmedium wachsen. Die nötige Energie liefert das Licht (abgesehen von den chemo- und organolithotrophen Organismen); der Kohlenstoff für alle Biosynthesen wird durch  $\text{CO}_2$ -Fixierung bereitgestellt. Es ist bekannt, daß auch in autotrophen Organismen der Ablauf des Energiemetabolismus hauptsächlich durch das intracelluläre Verhältnis von AMP, ADP und ATP zueinander kontrolliert wird. In einer Zelle mit hoher ATP- und geringer AMP-Konzentration ist der Durchsatz durch die Glycolyse gedrosselt, da die Phosphofruktokinase gehemmt und die Fruktose-Diphosphat-Phosphatase aktiviert werden. Es liegt unter diesen Bedingungen eine hohe

Konzentration an Fruktose-6-Phosphat und Glucose-6-Phosphat vor. Das aus Glucose-6-Phosphat entstehende Glucose-1-Phosphat liefert die Glucosyl-Gruppen für die Polysaccharidsynthese. Geringe Konzentrationen an AMP (gleichbedeutend mit hoher ATP-Konzentration) bewirken weiterhin die Biosynthese von Fettsäuren, weil die Acetyl-CoA-Carboxylase unter diesen Bedingungen eine höhere Affinität für Acetyl-CoA aufweist als Citrat-Synthetase (Krebs-Zyklus). Es entstehen damit keine für viele Biosynthesen wichtige Zwischen- und Endprodukte des Zitronensäurezyklus. Sinkt der ATP-Spiegel, so läuft der Kohlenstofffluß wieder bevorzugt über den Krebszyklus, wobei erneut ATP entsteht. In "energiereichen" Zellen werden also sowohl Fett als auch Polysaccharide gespeichert und der Abbau der Glucose zu Triosen und deren Weiterverwendung im Zitronensäurezyklus unterbunden. Diese wenigen Beispiele zeigen, daß es theoretisch möglich ist, durch Steuerung des Kohlenstoffdurchsatzes das Angebot an Zwischenprodukten als Ausgangspunkt von Biosynthesen den Energiebedingungen der Zelle anzupassen.

Diese Arbeit entstand aus folgender Zielsetzung:

1. Es galt nachzuprüfen, ob Algen eine Möglichkeit zur Regulation der Aktivität oder der Synthese der Aminosäuren biosynthetischen Enzyme besitzen, oder ob beim Übergang von der heterotrophen zur autotrophen Lebensweise in der Evolution diese Feinregulation der einzelnen Synthesen verloren ging und nur der Kohlenstofffluß für die Biosynthesen als ganzes reguliert wird.

Ein Biosyntheseweg, dessen Regulation bei mehreren Mikroorganismen gut studiert ist und der auch bei höheren Pflanzen eine wesentliche Rolle spielt, sollte zu den Untersuchungen herangezogen werden. Die Regulation des stark verzweigten Synthesewegs der aromatischen Aminosäuren, dessen Zwischen- und Endprodukte Ausgangspunkte so wichtiger Biosynthesen wie der der Nikotinsäure, des Lignins, der Folsäure, des Vitamin K des Ubichinon etc. darstellen, wurde bei Algen untersucht. Ein

bestimmter, bisher noch nicht bekannter Typ der Regulation verzweigter Biosynthesewege wurde gefunden.

2. Ein besonders interessantes Enzym, mit regulatorischen Eigenschaften, wurde herausgegriffen, erstmals hoch angereichert (ca. 2900fach) und eingehend charakterisiert. Dieses Enzym, die Chorismat Mutase von *Euglena*, wird durch Phenylalanin und Tyrosin gehemmt und durch Tryptophan aktiviert.
3. Neben den Untersuchungen über die Regulation der Enzymaktivität sind auch solche über die Regulation der Enzymsynthese wünschenswert. Die Aussagen, die sich auf Grund von Experimenten mit "normalen" Zellen machen lassen, sind nur sehr indirekt und nicht eindeutig. Nur auxotrophe Mutanten können klare Beweise für oder gegen die Regulation der Enzymsynthese liefern. Es wurde nach Methoden gesucht und auch solche erstmals für eine coccale Alge gefunden, mit Hilfe eines chemischen Mutagens aminosäureauxotrophe Algenmutanten herzustellen und zu isolieren.

## II. MATERIAL UND METHODEN

=====

### 1. Organismen und Medien

Aus der Algensammlung des Pflanzenphysiologischen Instituts der Universität Göttingen erhielten wir folgende in den Versuchen verwendete Organismen:

Blualgen: *Anacystis nidulans* 1402 - 1  
          *Anabaena variabilis* B 1403 - 4a  
          *Oscillatoria tenuis* B 1459 - 4  
          *Nostoc spec.* B 1453 - 5  
Grünalgen: *Chlamydomonas reinhardtii* 32a - 11  
          *Zygnema spec.* 477 - 11

Die Grünalgen *Maesotaenium* und *Ankistrodesmus spec.* entstammten der Algensammlung des Bot. Instituts in München.

Herr Dr. G. Richter stellte uns freundlicherweise eine sterile Kultur von *Euglena gracilis* 1224 - 5125 zur Verfügung.

Für die Anzucht der Blaualgen erwies sich das Basalmedium AA von Singh und Singh (1964) als gut geeignet. Grünalgen wurden gewöhnlich im Salzmedium nach Ruppel (1962), *Euglena gracilis* mixotroph nach dem Medium von Hutner et al. (1956), verändert nach Spiess und Richter (1966) gezogen. Großanzuchten von *Euglena* erfolgten in dem von Browerman (1964) modifizierten Hutner Medium. Autotroph wurden *Euglena*anzuchten nach der Vorschrift von Ohmann (1964), verändert nach Spiess und Richter (1966), kultiviert, allerdings mit 0,3 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ /l statt 0,0004 g/l. Für die Anzucht von *Chlamydomonas reinhardtii* verwendeten wir die Salzlösung nach Ruppel, angereichert mit 0,07 % Bacto-Trypton (Difco), 0,07 % Hefe-Extrakt, 0,035 % Natriumacetat (Pringsheim 1968) und 0,2 % Glucose.

#### Sterilitätskontrolle

Routinemäßig wurden alle Kulturen bzw. Anzuchten vor der Ernte im Phasenkontrastmikroskop auf Infektionen untersucht. Ebenso erfolgte stets Ausstrich auf Vollmediumplatten (1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 1,5 % Agar und 0,2 % Glucose). Bis auf die Blaualgen *Anabaena*, *Oscillatoria* und *Nostoc* wurden stets sterile Kulturen zu den Versuchen herangezogen. Es gelang uns nicht, die genannten Blaualgen zu reinigen, da die Bakterieninfektionen offensichtlich in der mehr oder weniger ausgeprägten Schleimhülle stecken. Das Ernten dieser nicht-sterilen Blaualgen erfolgte durch niedertourige Zentrifugation. Das Sediment wurde 2 - 3 mal mit 0,9 % NaCl-Lösung gewaschen, in Puffer aufgenommen und von dieser Suspension vor der Ultraschallbehandlung entsprechende Verdünnungen auf Vollmediumplatten mit 0,2 % Glucose plattiert. Die aus der Keimzahl der Kontamination errechnete Verunreinigung des Blaualgenextrakts durch Bakterienprotein war stets geringer als 1 Promille.

## 2. Anzuchten

Die Blaualgen wurden in 400 ml fassenden Röhren mit spitzem Boden (Durchmesser 5 cm, Höhe 43 cm) angezogen und mit einem 5 % CO<sub>2</sub>-Luft Gemisch begast. Das Wachstum erfolgte bei Dauerlicht und einer Temperatur von 24°. Grünalgen wurden sowohl in solchen Röhren, als auch in 2 Liter Fernbachkolben mit je 300 ml Medium im Licht bei 22 - 24° als Schüttelkulturen angezogen. Stämme, die mit 0,2 % Glucose besser wuchsen als in rein autotropher Kultur, wurde in Schüttelanzuchten diese C-Quelle zugesetzt. Sie hatte weder Einfluß auf die Menge noch Aktivität der untersuchten Enzyme. Zur Massenzucht von *Euglena gracilis* wurde das veränderte Hutner-Medium verwendet. Der p<sub>H</sub> von 3,6 dieses mixotrophen Mediums vermindert die Gefahr der Bakterieninfektion erheblich. Außerdem wächst *Euglena* in diesem Medium fast doppelt so schnell wie bei autotropher Anzucht. Die Großanzucht erfolgte in fünf 15 Ltr. Enghalskolben mit je 11 - 12 Liter Medium. Luft wurde mit drei Membranpumpen (je 20 Ltr./min) durch Keramikfilterkerzen (Schott u. Gen. G2) eingepresst. Die Anzuchten wurden mit 600 ml einer hochgewachsenen Kultur angeimpft und unter ständiger Beleuchtung bei 24 - 29° gezogen. Nach einer Lagzeit von 14 - 16 Stunden wuchsen die Euglenen mit einer mittleren Generationszeit von 6,1 Stunden. Die Zellzahl pro ml wurde mit einer Neubauer Zählkammer ermittelt. Sobald die Kultur eine Zelldichte von 5-8 x 10<sup>7</sup> Zellen/ml erreichte, wurde die Anzucht abgebrochen, die Zellen abzentrifugiert, mit 0,9 % NaCl Lösung gewaschen und sofort zur Extraktbereitung verwendet.

## 3. Extraktbereitung

### a) Durch Beschallen

Die Zellen wurden während der logarithmischen Phase des Wachstums in der Regel durch Zentrifugation bei niedrigen g Zahlen geerntet, zweimal mit 0,9 % NaCl Lösung und zweimal mit dem Dialysepuffer für den folgenden Enzymtest gewaschen, sodann in wenigen ml des gleichen Puffers aufgenommen und durch Ultraschallbehandlung (Branson Sonifier S 75) desintegriert (4-6 malige, 15 Sekunden dauernde Behandlung bei Stufe 4<sup>1</sup>). Sekühlt

wurde mit einem Eis-Alkohol-Gemisch, die Temperatur überschritt  $6^{\circ}$  nicht. Die Kontrolle über den Aufschlußgrad erfolgte im Mikroskop. Durch zehnmünütige Zentrifugation bei  $0 - 4^{\circ}$  und 20 000 g wurden die Zellrückstände beseitigt. Dieser "Rohextrakt" wurde sodann von niedermolekularen Bestandteilen durch Dialyse oder Chromatographie auf G 25 oder G 50 getrennt.

#### b) Durch Pottern und Beschallen

*Zygnema spec.* wurde durch Filtration geerntet, da sich die Fäden nicht abzentrifugieren ließen; das Filtrat wurde, wie oben angegeben, gewaschen, der feuchte, filzige Belag in ein 6 ml fassendes Pottergefäß gegeben, mit wenigen ml Puffer versetzt und ca. 6 Min. bei Eiskühlung mit einem Teflonstößel homogenisiert. Dieser zähflüssige, großenteils noch zellige Extrakt wurde, wie oben beschrieben, mit Ultraschall aufbereitet und weiter behandelt.

Die Extraktbereitung für die Enzymreinigung der Chorismat-Mutase weicht etwas von Schema a ab und wird unter Enzymreinigung genauer beschrieben.

#### 4. Binbau von $C^{14}$ -Aminosäuren

Sterile Kulturen von *Anacystis nidulans* 1402-1 wurden bei  $41^{\circ}$  und Dauerlicht unter ständigem Schütteln im Nährmedium nach Kratz und Mayers (1955) angezogen. Die 200 ml Erlenmayerkolben waren mit 25 ml Medium beschickt, das 40 mg/ml  $C^{12}$ -Aminosäure und 0,02 mc/ml  $C^{14}$ -Aminosäure enthielt. Entnahmen erfolgten mit dem Augenblick des Animpfens alle drei Stunden. Die Proben wurden in Eis gestellt, auf 10 % Trichloressigsäure gebracht, 12 Stunden in der Kälte stehen gelassen, das Präzipitat auf einem Whatman GF/C Glassfiberfilter gesammelt, 2 mal mit 10 % TCE mit 1 % Casamino-Acids (Difco) plus 1 mg/ml D,L-Tryptophan gewaschen, einmal mit  $-20^{\circ}$  kaltem, 70 % Athanol nachgespült, unter einer Infrarotlampe 20 Min. getrocknet und mit einem Friesecke und Höpfner Methangasdurchflußzähler (Ausbeute 40 %) die Radioaktivität bestimmt.

## 5. Herstellung und Isolierung von Aminosäuremangelmutanten von Ankistrodesmus

2 ml einer Kultur von Ankistrodesmus in Ruppelmedium plus 0,2 % Glucose wurden mit N-Methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidin bis zu einer Endkonzentration von 200  $\mu\text{g/ml}$  versetzt und 180 Min. im Dunkeln geschüttelt. Zu diesem Zeitpunkt waren etwa 98 - 99 % der Zellen getötet. (Ausplattieren auf Vollmediumplatten) Durch Zugabe von 50 ml sterilem Salzmedium, supplementiert mit 1 % Tryptone (Difco) und 0,2 % Glucose, wurde das Mutagen ausreichend verdünnt. Von der mutagenisierten und nach einer lag-Zeit von 3 - 4 Tagen hochgewachsenen Kultur wurden 0,1 ml einer  $10^{-3}$  und  $10^{-4}$  Verdünnung steril auf eine Vollmediumplatte gebracht und gleichmäßig verteilt. Die Petrischalen wurden mit Parafilm verschlossen und bei  $22^{\circ}$  im Dauerlicht inkubiert. Sobald die Kulturen Stecknadelkopfgröße erreicht hatten, wurde das Koloniemuster mit Hilfe des Stempeltests erst auf zwei Minimalplatten und zur Kontrolle dann auch noch auf eine Vollmediumplatte übertragen. Die Kolonien, die auf der Kontrollplatte wuchsen, nicht aber auf den Platten mit Minimalmedium plus 0,4 % Glucose, wurden gereinigt und erneut auf ihren Wachstumseffekt hin untersucht. Als nächstes folgte dann der Test in Flüssigkulturen. Alle so isolierten "Mutanten" wurden in Vollmedium angezogen und mit gleichen Volumina davon Kulturen in Voll- und Minimalmedien angeimpft, die bei identischen Bedingungen ( $22^{\circ}$ , schütteln, Dauerlicht) kultiviert wurden. Es zeigte sich, daß der Großteil der isolierten Stämme im Vergleich zum Wildstamm im Minimalmedium langsamer wuchs, aber doch, wenn auch mit erheblicher Verzögerung, fast die gleiche Zelldichte erreichte wie der Wildstamm. Diese Stämme wurden verworfen. Die als Mutanten bezeichneten Stämme waren entweder überhaupt nicht in der Lage in Minimalmedien normale Algenzellen zu bilden oder wuchsen im Salzmedium um das zehnbis zwanzigfache langsamer als der Wildstamm. Im Vollmedium hatten alle Mutanten eine dem Wildtyp entsprechende Wachstumsgeschwindigkeit.

## 6. Enzymteste

### a) DAHP-Synthetase Test

Der Test wurde leicht verändert nach Smith et al. (1962) durchgeführt. Der Ansatz, in einem Gesamtvolumen von 0,4 ml enthielt 40  $\mu$ Mole Kaliumphosphat  $p_h$  6,5; 0,8  $\mu$ Mole PEP (Boehringer) und 0,8  $\mu$ Mole E4P. Nach zehnmütiger Inkubation, in der Regel bei 37°, wurden die Proben ins Eis gestellt, das Protein durch Zugabe von 0,05 ml 20 % TCE gefällt und der Niederschlag 5 Min. bei 12 000 g abzentrifugiert. 0,25 ml des Überstandes wurden zur Bestimmung der DAHP nach Smith et al. (1962) genommen. Die Proben wurden bis zur Messung der Extinktion bei 549 m $\mu$  in einem Wasserbad bei 55° (Jensen und Nester 1966 a) aufbewahrt.

Als Kontrolle dienten bei jedem Test folgende Ansätze:

Extrakt ohne Substrat

Extrakt mit einem Substrat

Beide Substrate ohne Extrakt

E4P zeigte stets eine geringfügige Eigenreaktion bei Nachweis auf DAHP.

### b) Anreicherung der DAHP-Synthetase

Der Rohextrakt wurde auf eine 2,5 x 7 cm DEAE Cellulose Säule aufgetragen, die mit 10<sup>-2</sup>M Kaliumphosphatpuffer  $p_h$  7,5 äquilibriert war; die Säule wurde mit einem 800 ml Gradienten von 0,05 M KCl bis 0,3 M KCl in 10<sup>-2</sup>M Puffer eluiert.

### c) Chorismat Mutase

Die Puffer für diesen Enzymtest, bzw. die Dialysepuffer enthielten alle 6 x 10<sup>-3</sup>M 2-Mercaptoäthanol. Den Phosphatpuffern lag das Kaliumsalz zugrunde. Vor der Bestimmung der Enzymaktivität wurden die Extrakte gegen einen 10<sup>-2</sup>M Tris-Cl Puffer  $p_h$  7,5 und 10<sup>-3</sup>M Phosphatpuffer mit gleichem  $p_h$  dialysiert. Der Enzymansatz entsprach dem von Nester und Jensen (1966), mit der Abweichung, daß ein Tris-Cl Puffer  $p_h$  8,1 in 0,1 M Endkonzentration verwendet wurde. Als Kontrollen dienten folgende Ansätze: Substrat ohne Extrakt, Extrakt ohne Substrat, Substrat und Aminosäureeffektoren ohne Extrakt und Aminosäureeffektoren mit Extrakt alleine. Wenn nicht anders angegeben,

wurde 30 Min. bei  $30^{\circ}$  inkubiert. Die während der enzymatischen Reaktion gebildete Prephensäure wurde nach einer der folgenden Methoden gemessen:

- α) Die erste beruht auf der Umwandlung von Prephensäure in Phenylpyruvat durch Säurebehandlung (0,5 N HCl 10 Min. lang bei  $30^{\circ}$ ), das bei 320 mμ in 0,8 N NaOH (Gibson und Gibson 1964) gemessen werden kann. Die Absorption wurde von 300 mμ bis 340 mμ alle 5 mμ gemessen, um sicherzustellen, daß das Absorptionsmaximum auch tatsächlich bei 320 mμ liegt und somit die Extinktion dem vorliegenden Phenylpyruvat entspricht. Die Werte der entsprechenden Kontrollen wurden abgezogen und die so erhaltene Extinktion der enzymatischen Aktivitätsbestimmung zugrunde gelegt.
- β) Bei der zweiten Methode wurde durch Zugabe von TCE (15 %) und anschließender Zentrifugation (10 Min. bei 12 000 g  $2^{\circ}$ ) die Probe proteinfrei gemacht und dann das Phenylpyruvat im Überstand bestimmt und identifiziert durch Messung des Keto-Enol Differenzspektrums mit und ohne Borat in 2 molarem Arsenat  $p_H$  6,5 (Lin et al. 1958). Diese Methode zeichnet sich gegenüber der ersten dadurch aus, daß man verschiedenen α-Ketosäuren von Aromaten auf Grund ihrer verschiedenen Absorptionsmaxima voneinander unterscheiden kann; so absorbiert z.B. p-Hydroxyphenylpyruvat bei 310 mμ, während das Maximum von Phenylpyruvat bei 300 mμ liegt. Beide Methoden liefern identische spezifische Aktivitäten. Zur Routineuntersuchung der Chorismat Mutase Aktivität wurde, des geringeren Aufwands wegen, Methode α verwendet.

#### d) Anthranilat Synthetase

Den Phosphatpuffern lag das Kaliumsalz zugrunde, alle Puffer hatten eine 2-Mercaptoäthanolkonzentration von  $6 \times 10^{-3} M$ . Die Extrakte wurden vor dem Einsetzen in den Enzymtest gegen einen 0,04 M Phosphatpuffer  $p_H$  7,0 mit  $5 \times 10^{-4} M$  Magnesiumchlorid dialysiert. Das Enzymtestgemisch entsprach weitgehend dem von Nester und Jensen (1966) beschriebenen. Die gebildete Anthranilsäure wurde durch die Bratton-Marshall Reaktion bestimmt (Ames et al. 1961). Die Testansätze wichen

bei Euglena Extrakten insoweit von den von Nester und Jensen beschriebenen ab, als die Anthranilat Synthetase Aktivität bei  $p_h$  7,5 und  $37^\circ$ , bei allen übrigen Organismen bei  $p_h$  8,0 und  $30^\circ$ , bestimmt wurde. Gleiche Kontrollen wie bei der Bestimmung der Chorismat Mutase Aktivität wurden verwendet.

e) und f) Prephenat-Dehydrogenase und Prephenat-Dehydratase wurden nach Nester und Jensen (1966) bestimmt.

Die Testsysteme und die Substrate für die Enzymteste wurden mit Extrakten von Escherichia coli K 12 überprüft. Die Bakterien wurden dazu aerob bei  $30^\circ$  auf Salzlösung P nach Fraenkel und Neidhart (1961), angereichert mit 0,2 % Ammonsulfat und 0,4 % Glucose, gezogen.

#### g) Amino-Acyl-tRNS-Synthetasen

Die Aminosäure aktivierenden Enzyme wurden nach der von Böck (1969) beschriebenen Methode getestet.

#### h) Fumerase

Dieser Test wurde nach Kanarak und Marler (1964) durchgeführt.

#### i) Laktatdehydrogenase

Laktatdehydrogenase Aktivität wurde nach der Vorschrift von Kornberg (1963) bestimmt. Die Oxidation des NADH durch Reduktion des Pyruvats zum Laktat wurde bei 340 m $\mu$  an einem Zeiss Spektralphotometer PMQ II verfolgt.

### 7. Herstellung der Substrate der enzymatischen Reaktionen

#### a) Erythrose-4-phosphat

E4P wurde durch Oxidation von Glucose-6-Phosphat bei sauerem  $p_h$  mit Bleitetraessigsäure nach der Methode von Ballou (1963) hergestellt. Die Ausbeute betrug zwischen 75 und 80 %.

#### b) Barium Chorismat

Der Darstellung dieses Substrats wurde die Vorschrift von F. Gibson (1964) zugrunde gelegt.

10 Liter Wachstumsmedium (Medium A) wurden mit 100 ml einer Übernachtskultur von *Aerobacter aerogenes* Stamm 62-1, gewachsen auf Medium A, angeimpft. Die Kultur wurde über zwei Filterkerzen mit 15 Ltr./Min. belüftet. Die Anzucht erfolgte bei 30°. Nach vier Stunden wurde eine optische Dichte von 3,93 bei 420 mμ gemessen. Die Zellen wurden in einer kontinuierlichen Zentrifuge abgeschleudert, dreimal mit 1 % Kochsalzlösung gewaschen und zwei Kolben mit je 10 Liter Akkumulationsmedium (Medium B) damit angeimpft. Belüftung und Temperatur war identisch mit der Anzucht. Die Bildung der Chorisminsäure wurde durch Messen des partikelfreien Mediums B, das 1 : 10 mit 0,1 normaler Natronlauge verdünnt wurde, bei 272 mμ verfolgt. Nach 14 Stunden nahm die Chorisminsäureausscheidung nicht mehr zu. Im Kolben a wurde eine Konzentration von etwa  $3,3 \times 10^{-4}$ , im Kolben b eine von  $2,7 \times 10^{-4}$  M Chorismat ermittelt. Die Zellen wurden aus dem Medium durch zehnminütige Zentrifugation bei 0° und 16 000 g beseitigt, der Überstand mit 80 ml 10 N NaOH versetzt, gut gemischt und unter Druck auf eine 5 x 16 cm Dowex X 1-4 Säule aufgetragen. Der Vorlauf wurde ständig auf Vorhandensein von Chorisminsäure überprüft. Nach dem Durchlauf der gesamten Akkumulationslösung wurde die Säule mit 1 M Ammonchlorid eluiert. Die Flußrate betrug 40 Tropfen/Min., Fraktionen mit 150 Tropfen wurden gesammelt. Diese wurden 1 : 300 mit Wasser verdünnt und ihre Extinktion (Abb. 1) bei 258, 270 und 286 mμ gemessen. (Bei 258 mμ hat Chorisminsäure ein typisches Absorptionsminimum, bei 270 ein Maximum und 286 mμ liegt wieder auf einem steil abfallenden Ast der Absorptionskurve.) Die Fraktionen 38 - 60 wurden gesammelt und das Bariumchorismat daraus nach Gibson (1964) dargestellt.

#### c) Barium Prephenat

Das Bariumprephenat wurde durch einstündige Inkubation von Chorismat im Alkalischen bei 70° nach Gibson (1964) gewonnen.

Die Ausbeute betrug 28 %, der Reinheitsgrad zwischen 90 und 100 %, je nachdem, ob man den von Metzberg und Mitchell (1951) den von Schwink und Adams (1959) oder den von Gibson (1964) ermittelten Extinktionskoeffizienten zugrunde legt.

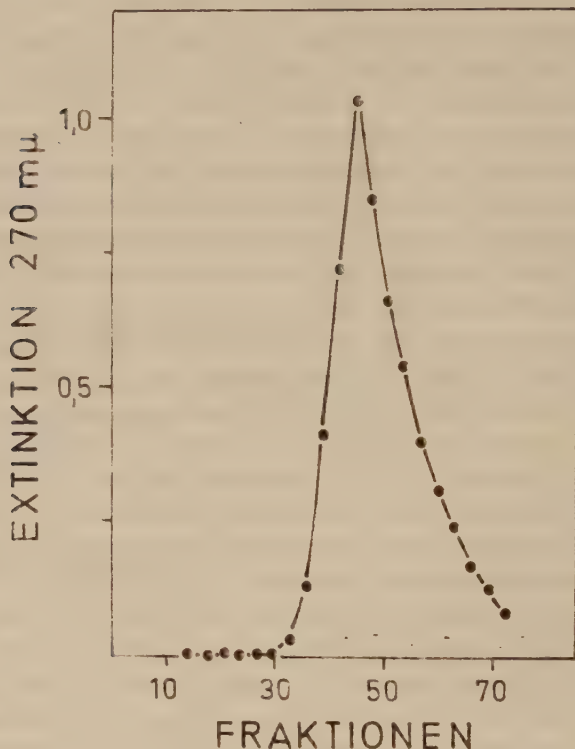


Abb. 1: Elutionsprofil der Chorisminsäure von Dowex X 1 - 4, mit 1 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$  eluiert. Näheres siehe Text.

d) tRNS

Die Isolierung der tRNS erfolgte durch eine kombinierte Methode, die sowohl die Extraktion mit Phenol (Ehrenstein und Lipman 1961) als auch die Fällung mit Isopropanol (Zubay 1962) beinhaltete.

## 8. Reinigung der Chorismat Mutase

Alle verwendeten Puffer enthielten 2-Mercaptoäthanol in einer Konzentration von  $6 \times 10^{-3} \text{ M}$ . Den Phosphatpuffern lag das Kaliumsalz zugrunde. Die Abkürzung SP wird für einen  $10^{-2} \text{ M}$  Tris-Cl Puffer  $p_h$  7,5 mit  $6 \times 10^{-3} \text{ M}$  2-Mercaptoäthanol verwendet. Sämtliche Reinigungsschritte wurden bei einer Temperatur von  $0 - 4^\circ \text{C}$  durchgeführt.

### a) Extraktbereitung

Die mit 1 % NaCl Lösung gewaschenen Zellen wurden in  $4 \times 10^{-2} \text{ M}$  Tris-Cl Puffer  $p_h$  7,5 mit  $1,8 \times 10^{-2} \text{ M}$  Mercaptoäthanol und  $10^{-3} \text{ M}$  Magnesiumchlorid aufgenommen, zentrifugiert, und der Niederschlag in soviel vom gleichen Puffer aufgenommen, daß mit dem Magnetührer noch eine gute Durchmischung erreicht wurde. Die Zellen wurden mit einem Branson Sonifier S 75 bei maximaler Leistung zerschallt. Als Kühlung diente ein Alkohol-Eisgemisch; die Temperatur des Extrakts wurde laufend kontrolliert;  $6^\circ$  war dabei die obere, tolerierte Temperaturgrenze.

### b) Zentrifugation

Durch halbstündige Zentrifugation bei 27 000 g wurde der Rohextrakt gewonnen (1 - 2 Liter). Zur Protein- und Aktivitätsbestimmung wurden 1 bis 2 ml entnommen und gegen SP dialysiert, der Rest durch Zentrifugation entweder 70 Min. bei 100 000 g oder 60 Min. bei 138 000 g von Zellorganellen, Membranen und Zellfragmenten befreit.

### c) Protaminsulfatfällung

Dazu wurde folgender Vorversuch durchgeführt:

Ein auf 10 mg/ml verdünnter Extrakt wurde in 9 Teile zu je 5,0 ml aufgeteilt. Zu jeder Probe wurde tropfenweise soviel 2 %iges Protaminsulfat zugegeben, bis eine Endkonzentration von 1, 2, .... bis 8 mg/50 mg Protein eingestellt war. Der neunte Teil diente als Kontrolle. Jede dieser Proben wurde 10 Min. bei Eiskühlung gerührt und sodann 15 Min. bei 16 000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf Enzymaktivität und

Proteingehalt getestet. Abb. 2 zeigt das Resultat. Entsprechend diesem Befund wurde nun der ribosomenfreie Extrakt auf 10 mg/ml verdünnt, um störende intermolekulare Wechselwirkungen zu vermeiden und bei Eiskühlung mit 2 % Protaminsulfatlösung versetzt, bis eine Konzentration von 7 mg/100 mg Protein erreicht war. Nach 90 Min. Rühren wurde 20 Minuten bei 16 000 g abzentrifugiert. Der so gewonnene Extrakt wurde einer Ammonsulfatfällung unterworfen.

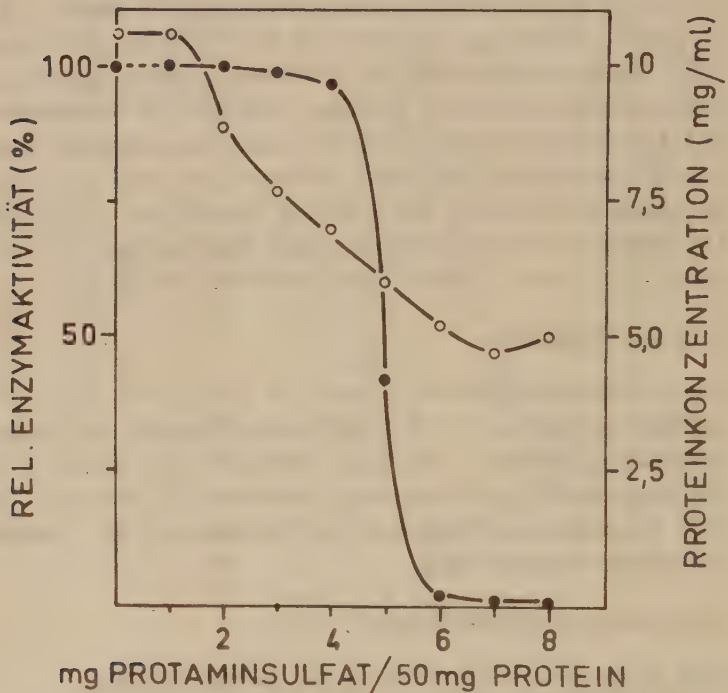


Abb. 2: Einfluß der Zugabe von steigenden Mengen Protaminsulfat auf die Proteinkonzentration und die Chorismat-Mutase Aktivität im Überstand der entsprechenden Rohextraktproben. ● relative Enzymaktivität bezogen auf die Kontrolle ohne Protaminsulfat, ○ Protein/ml.

#### d) Ammonsulfatfällung

Der besseren Reproduzierbarkeit, der genaueren Handhabung und der schonenderen Prozedur wegen wurde stets mit, bei 0 - 4°C gesättigter, Ammonsulfatlösung gefällt, und zwar durch tropfenweise Zugabe aus einem Vorratsbehälter in die gutgerührte und eiskühlte Proteinlösung. War die entsprechende Menge zugetropft, so daß eine Endkonzentration von 33 %, 37 % und 42 % erreicht war, wurde jeweils 30 Min. weitergerührt und dann 15 Min. bei 16 000 g und 0° abzentrifugiert. Die Niederschläge wurden in wenigen ml SP. gelöst und zweimal gegen einen 50fachen Überschuß an SP dialysiert. Nach der Bestimmung des Proteingehaltes und der Enzymaktivität schloß sich der nächste Doppelschritt, eine fraktionierte Ad- und Desorption an Calciumphosphatgel an.

Tab. 1: Fraktionierte Ad- und Desorption an Calciumphosphatgel einer typischen Enzymreinigung. Nähere Beschreibung im Text.

| Verhältnis<br>Gel/Protein | Molarität des<br>Phosphats beim<br>Eluieren | spez.<br>Aktivität | Protein-<br>menge |
|---------------------------|---------------------------------------------|--------------------|-------------------|
| 0,5                       | 0,2                                         | 0,85               | 353 mg            |
| 0,7                       | 0,025                                       | 57                 | 507 mg            |
| 0,7                       | 0,2                                         | 0,0                | -                 |
| 1,0                       | 0,025                                       | 33,1               | 132 mg            |
| 1,0                       | 0,2                                         | 2,1                | -                 |
| 1,3                       | 0,025                                       | 0,0                | 2,34 g            |
| 1,3                       | 0,2                                         | 0,0                | -                 |

Spez. Aktivität: gebildete  $\mu$ Mole Prephenat/mg Protein/h  
( - bedeutet nicht bestimmt)

e) Ad- und Desorption an Calciumphosphatgel

Das Gel wurde nach Keilin und Hartree (1938) dargestellt. Die Fraktionen 33 % und 37 % der Ammonsulfatfällung wurden vereinigt und auf 10 mg/ml Protein durch SP verdünnt. Tropfenweise wurde zu dieser eisgekühlten Lösung unter Rühren soviel Calciumphosphatgel zugegeben, daß ein Gel-Proteinverhältnis von 0,5 erreicht wurde. Nach 20 minütigem Rühren wurde 5 Min. bei 8 000 g zentrifugiert, das Gel dreimal mit SP durch Aufwirbeln mit nachfolgender Zentrifugation gewaschen, alle Überstände vereinigt und dem nächsten Adsorptionsschritt unterworfen. Diese Arbeitsvorgänge wiederholten sich bei den folgenden Schritten, in denen ein Gel-Proteinverhältnis von 0,7; 1,0; 1,3; und 1,9 eingestellt wurde. Zur Desorption des Proteins vom Gel wurden die Fraktionen 0,5; 1,3 und 1,9 mit wenigen ml 0,2 molarem Phosphatpuffer  $p_h 7,5$ , die Fraktionen 0,7, 1,0 und 1,3 mit  $2,5 \times 10^{-2}$  molarem Puffer wie oben versetzt, das Gel mit einem Spatel klümpchenfrei zerdrückt und 5 Min. bei 8 000 g zentrifugiert. Dieser Vorgang wiederholte sich viermal, jedoch nach dem letzten Versetzen mit Phosphatpuffer wurde bei 16 000 g zentrifugiert. Die Fraktionen 0,7, 1,0 und 1,3 wurden auch noch wie beschrieben mit 0,2 molarem Phosphat eluiert. Alle so gewonnenen Fraktionen wurden gegen SP dialysiert, danach ihre Proteinkonzentration bestimmt und die Enzymaktivität gemessen. Die aktiven Fraktionen, 0,7 und 1,0 wurden im nächsten Schritt auf einer Hydroxylapatit-Säule chromatographiert.

f) Chromatographie auf Hydroxylapatit  $p_h 7,5$

Eine Säule mit Hydroxylapatit (8 x 5 cm) wurde mit dem dreifachen Volumen 0,5 molarem Phosphatpuffer  $p_h 7,5$  regeneriert, mit 4 bis 5 Volumina SP unter Druck gewaschen und die dialysierten Fraktionen 0,7 und 1,0 aufgetragen. Eluiert wurde mit einem 2 l linearen Gradienten von Tris-Cl  $p_h 7,5$  auf Tris-Cl  $p_h 7,5$  mit 0,05 M Phosphat  $p_h 7,5$ . Fraktionen mit 150 Tropfen wurden gesammelt, auf Enzymaktivität getestet; die aktiven Fraktionen davon wurden vereinigt und gegen einen Tris-Cl Puffer  $p_h 7,1$  dialysiert. Hierauf erfolgte Proteinbestimmung

und Messung der enzymatischen Aktivität der vereinigten Fraktionen 45 mit 63, bevor sie auf die nächste Hydroxylapatit-säule aufgetragen wurden.

#### g) Chromatographie auf Hydroxylapatit $p_h$ 7,1

Die gleiche Säule wurde wie beschrieben mit 0,5 molarem Phosphatpuffer  $p_h$  7,1 regeneriert, mit dem entsprechenden Tris-Cl Puffer gewaschen und das Protein aufgetragen. Mit einem linearen 2 l Gradienten  $10^{-2}$  Tris-Cl  $p_h$  7,1 zu  $10^{-2}$  Tris-Cl  $p_h$  7,1 plus 0,05 molarem Phosphatpuffer  $p_h$  7,1 wurde eluiert. In den Fraktionen (150 Tropfen) 43 bis 57 befand sich enzymatisch aktives Protein; sie wurden vereinigt und gegen einen  $10^{-2}$  M Tris-Cl Puffer  $p_h$  7,8 dialysiert. Hierauf wurde der Proteingehalt und die Enzymaktivität bestimmt und sodann das Protein auf die nächste Säule gebracht.

#### h) -Chromatographie auf Hydroxylapatit $p_h$ 7,8 - 7,0

Bei diesem Schritt wurde eine 15 x 3 cm Hydroxylapatitsäule verwendet. Regeneriert und gewaschen wurde sie wie oben beschrieben mit Puffer vom  $p_h$  7,8. Der 2 l Gradient bestand im Gradientenmischgefäß aus 1 Liter  $10^{-2}$  molarem Tris-Cl Puffer  $p_h$  7,8, im Reservoir aus 1 l 0,03 molarem Phosphatpuffer  $p_h$  7,0. 150 Tropfen Fraktionen wurden gesammelt. Die Fraktionen 19 bis 29 zeigten die höchste enzymatische Aktivität, sie wurden gesammelt und gegen SP dialysiert.

#### i) Einengen auf Hydroxylapatit $p_h$ 7,5

Eine wie beschrieben regenerierte und mit SP gespülte Säule (1 x 2 cm) wurde mit den dialysierten Fraktionen 19 bis 29, nach Bestimmung des Proteingehalts und der enzymatischen Aktivität, beschickt. Eluiert wurde mit 0,2 molarem Phosphat  $p_h$  7,5. Das gesamte Protein war in etwa 4,5 ml enthalten, die auf eine G 200 Sephadex aufgetragen wurden.

#### k) Chromatographie auf G 200 Sephadex Gel

G 200 Sephadex Gel wurde nach Vorschrift des Herstellers gequollen und eine 2,5 x 80 cm Säule gegossen. Sie wurde vor

Benutzen eine Woche mit einem  $10^{-2}$  M Phosphatpuffer  $p_h$  7,5 mit 0,1 M Kaliumchlorid bei einer konstanten Durchflußrate von ca. 4 ml/h äquilibriert. Das aufzutragende Protein wurde mit Saccharose versetzt und durch vorsichtiges Unterschichten auf die Säule aufgetragen. Fraktionen von 40 Tropfen wurden aufgefangen.

## 9. Physikalische und biochemische Methoden

### a) Gradientenzentrifugation

5 ml Gradienten von 5 % bis 20 % Saccharose wurden nach Martin und Ames (1961) in SP hergestellt. Die Gradienten wurden mindestens 4 Stunden vorgekühlt, mit 0,15 ml einer Probe überlagert und 12 bis 16 Stunden bei  $0^\circ$  und 40 000 UpM im SW 50 L Rotor in einer Spinco L 2 - 65 B zentrifugiert. Nach dem Lauf wurden die Nitrocellulosebecher mit einem Anstechapparat am tiefsten Punkt angezapft und der Inhalt mit einer Pumpe (10 ml) über einen Fraktionskollektor entleert. Fraktionen mit 3 Tropfen wurden aufgefangen.

### b) Molekulargewichtsbestimmung durch Gelfiltration

Die Chromatographie wurde nach Andrews (1964) an einer Sephadex G 200 Säule (2,5 x 80 cm) durchgeführt. Abb. 4 gibt die Lage der Eichproteine wieder. Durch Chromatographie von 5 mg ribosomenfreien Extrakt von Escherichia coli K 10 wurde die Position der angegebenen Aminoacyl-tRNS-Synthetasen nach Nass und Stoffler (1967) ermittelt.

### c) Elektrophoresen

#### ca) Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Gelelektrophorese wurde nach Maurer (1968) mit einem 7,5 % Gel des Gelsystems No. 1 durchgeführt. Als Elektrolysepuffer diente ein Tris-Glycin Puffer  $p_h$  8,3. Fixiert wurde mit 12,5 % TCE, gefärbt mit Coomassie Blau nach Chrambach et al. (1967).

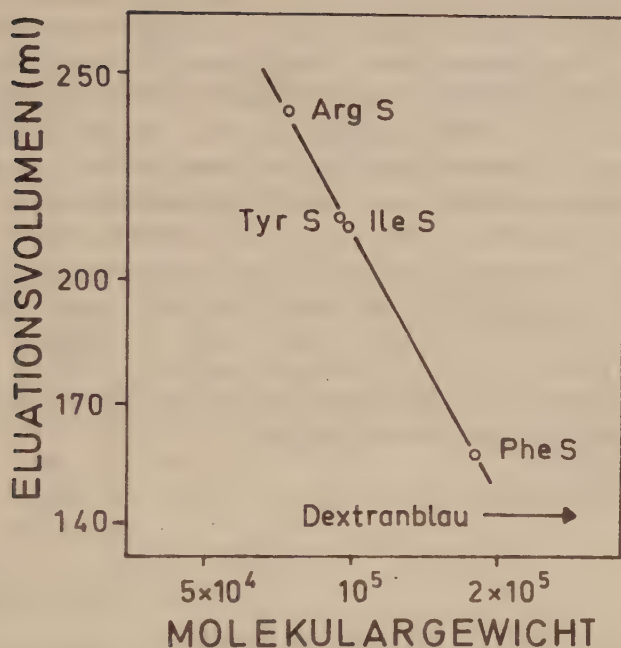


Abb.3: Sephadex G 200 Eluationsdiagramm der Arginyl-, Tyrosyl-, Isoleucyl- und Phenylalanyl-tRNS-Synthetasen von 5 mg ribosomenfreien E.coli Extrakt. Zu den Enzymtesten wurden entsprechende aliquote Teile genommen.

#### cb) Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamidgel Elektrophorese

Sie wurde nach der Vorschrift von Shapiro (1967) durchgeführt. Fixierung und Färbung erfolgten nach dem gleichen Autor. Die gereinigte Chorismat Mutase wurde nach dreistündiger Inkubation in 1 % SDS bei 37° mit Jodacetamid bis zu einer Konzentration von 2 % versetzt und weitere 90 Min. inkubiert, um Aggregation während der Elektrophorese zu verhindern. Das Perameisensäure behandelte Enzym wurde 16 h gegen 0,1 % SDS dialysiert und dann auf das Gel aufgetragen.

## cc) Präparative Elektrophorese

Das verwendete Gel, ein 7,5 % Polyacrylamidgel, unterscheidet sich von dem Gelsystem No. 1 von Maurer nur dadurch, daß statt 1 Teil Wasser und 1 Teil Tris-Cl  $p_h$  8,9 (19 g/100 ml plus 0,223 ml TMED) 2 Teile Tris-Cl  $p_h$  8,0 (4 g/100 ml plus 0,115 ml TMED) verwendet wurden. Um dem Gel einen glatten und geraden Abschluß zu geben, wurde über einer Glycerinschicht polymerisiert. Um die Elutionskammer möglichst klein zu gestalten, wurde eine Dialysmembran über einen passenden Gummiring gelegt und dieser gegen das untere Gelende bis zu einem Abstand von circa 3 mm geschoben. Eluiert wurde mit dem Gelpuffer, jedoch ohne Zusatz von TMED, als Elektrodenpuffer diente ein Tris-Glycin Puffer  $p_h$  9,0 (3 g Tris + 14,4 g Glycin mit NaOH auf  $p_h$  9,0). Mit einem Kryostaten wurde die ganze Anlage auf 12° gekühlt.

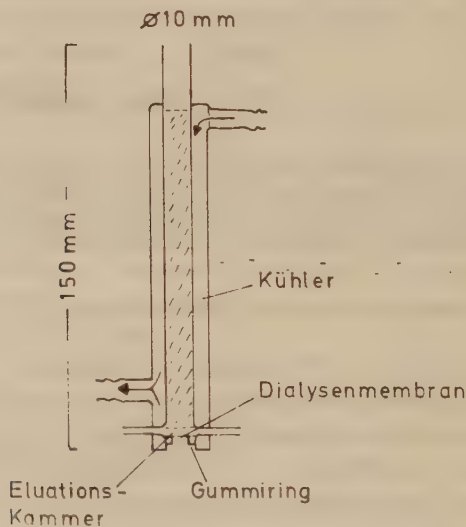


Abb. 4: Glasapparatur für die kontinuierliche, präparative Diskelektrophorese

## 10. Weitere kolorimetrische und optische Bestimmungen

- a) p-Hydroxyphenylpyruvat wurde als Millon'sche Base nach Schwink und Adams (1959) gemessen
- b) Proteinbestimmung erfolgte nach einer der folgenden Methoden:
- ba) durch Fällern mit TCE und Trübungssung bei 540 mμ. Diese Methode wurde vor allem bei undialysierter Extrakten zur groben Bestimmung verwendet.
- bb) mit dem Folin Phenol Reagens nach Lowry et al. (1951). Als Standardprotein wurde Rinderserumalbumin verwendet.
- bc) durch Messen der Absorption bei 215 und 225 mμ. Die Differenz dieser Messung, multipliziert mit 144 ergibt nach Waddell (1956) die μg/ml. Diese Methode wurde bei höher gereinigten Enzympräparationen verwendet.

## 11. Chemikalien

Die Chemikalien waren, ausgenommen bei Großanzuchten von Euglenakulturen, von höchstmöglicher Reinheit.

Von der Firma Boehringer, Mannheim, wurden bezogen:

Chymotrypsinogen, Fumarase, Lactatdehydrogenase, ATP, NAD<sup>+</sup>, NADH, NADP<sup>+</sup>, G-6-P, PEP.

Rinderalbumin, Rinderhaemoglobin und Tris stammten von der Firma Fluka.

Ovalbumin, DEAE-Cellulose und TMED lieferte die Firma Serva, Heidelberg.

Die Sephadex Gele G 20, G 50 und G 200 waren Produkte der Firma Pharmacia.

Hydroxylapatit (Bio-Gel HTP) wurde von Bio-Rad-Laboratories und pCMB von Sigma Chemical Company bezogen.

## Radiochemikalien

Vom "The Radiochemical Centre" Amersham stammen:

L-<sup>14</sup>C-Phenylalanin, L-<sup>14</sup>C-Argenin, L-<sup>14</sup>C-Tyrosin, L-<sup>14</sup>C-Leucin und L-<sup>14</sup>C-Isoleucin. So nicht anders angegeben wurden die Chemikalien mit einer spezifischen Aktivität von 10 mC/mMol verwendet.

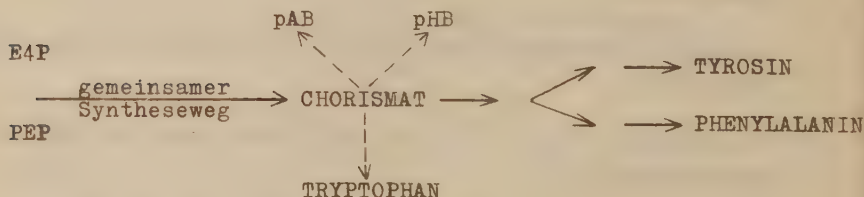
## III. RESULTATE

=====

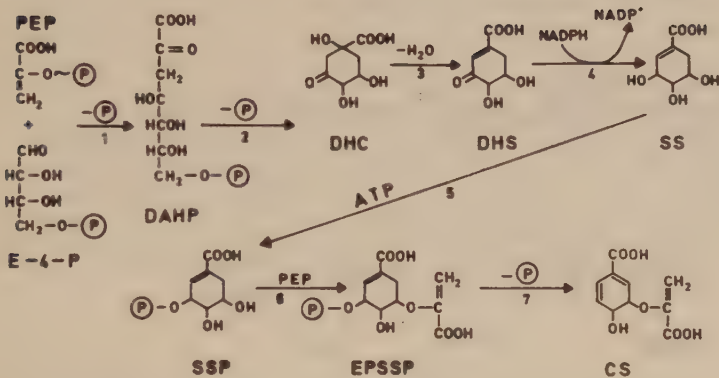
### 1. Vergleich der Regulation der Enzymaktivität im Aromatensyntheseweg

#### A. SYNTHESEWEG

Die gemeinsame Biosynthese aller Produkte führt über die Chorisminsäure. Dieses wichtige Zwischenprodukt ist Ausgangspunkt der Synthesen zu den Aminosäuren Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan, daneben auch noch zu Produkten wie Nikotinsäure (über Tryptophan), Tetrahydrofolsäure (über p-Aminobenzoessäure pAB), Ubichinon (über p-Hydroxybenzoessäure pHB), Vitamin K (über -Naphtol) und 2,3-Dihydroxybenzoylserin (über 2,3-Dihydroxybenzoessäure).



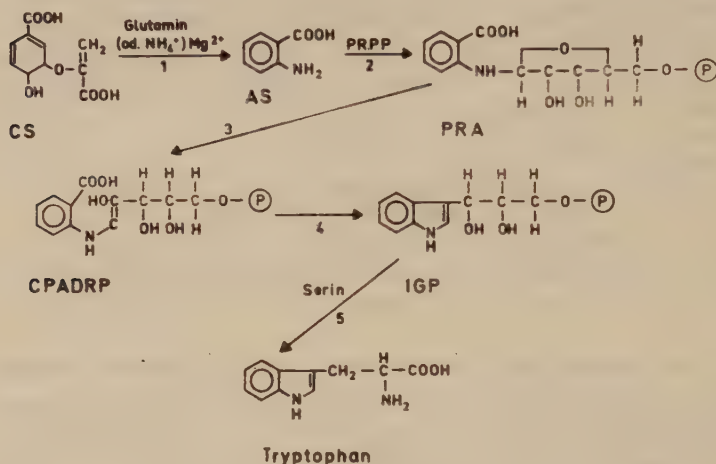
a) Biosynthesegrundzweig



Durch die DAHP-Synthetase (1) werden PEP und E4P zu einem  $C_7$  Körper, dem 2-Keto-3-desoxyarabinoheptonsäure-7-Phosphat (DAHP), kondensiert. Der nächste Schritt (2) führt unter Phosphatabspaltung zur 5-Dehydrochinonsäure (DCS), die durch das Enzym Dehydrochinat Dehydratase (3) dehydratisiert wird. Das Produkt, die Dehydroshikimisäure (DHS) wird weiter mit  $NADPH + H^+$  und der Shikimat Reduktase zur Shikimisäure (SS) reduziert und über eine Kinase-Reaktion unter ATP-Verbrauch (5) mit Phosphorsäure verestert. Eine Synthetase setzt Phosphoenolpyruvat mit dem Shikimisäure-5-Phosphat (SSP) zum entsprechenden 3-Enolpyruvyläther (6) um (3-Enolpyruvylshikimisäure-5-Phosphat = EPSP). Unter Phosphorsäureabspaltung entsteht durch die Chorismat-Synthetase (7) der Enolpyruvyläther der trans-3,4-Dihydroprotocatechusäure, bekannt unter dem Namen Chorisminsäure (CS). Dieses entscheidende Zwischenprodukt konnte erstmals von Gibson 1964 identifiziert und isoliert werden. Er ging von der Überlegung aus, daß eine Dreifachmutante, die zum Wachstum sowohl Tryptophan wie Tyrosin und Phenylalanin benötigt, aber den gemeinsamen Biosyntheseweg bis zum EPSP besitzt, das gesuchte Produkt ins Medium abgeben müßte. *Aerobacter aerogenes* 62-1 stellt eine solche Mutante dar. Das akkumulierte Zwischenprodukt wurde von Gibson Chorisminsäure benannt. Es gelang seiner Arbeitsgruppe

nachzuweisen, daß diese Substanz enzymatisch in Anthranilsäure, Prephensaure, 4-Hydroxybenzoesäure und 4-Aminobenzoesäure umgesetzt werden kann.

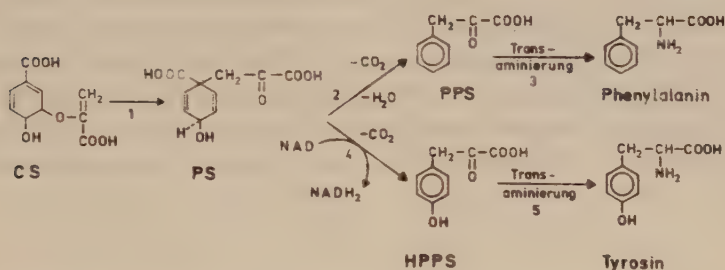
## b) Biosyntheseweg zum Tryptophan



Für die Umwandlung der Chorisminsäure (CS) zur Anthranilsäure (AS) ist häufig ein Multienzymkomplex verantwortlich. Bei *E. coli* machten Somerville und Elford (1967) wahrscheinlich, daß die Reaktion in zwei Stufen abläuft, wobei zum ersten Schritt Glutamin und zum zweiten Magnesium benötigt wird. Lingens schreibt noch 1968, daß der Amidstickstoff des Glutamins die Aminogruppe der Anthranilsäure liefert, während Edwards, Gibson et al. bereits 1964 nachwiesen, daß Ammoniumionen bei hohem  $p_H$  Wert als  $\text{NH}_2$ -Donatoren für die Bildung der Anthranilsäure in Rohextrakten von *Aerobacter aerogenes* verwendet wurden. Gibson et al. gelang es 1967 mit einer Doppelmutante nachzuweisen, daß auch der in vivo Mechanismus über das Ammoniumion geht. Wahrscheinlich gehören viele, möglicherweise alle Enzyme der Biosynthesekette des Tryptophans, nämlich Anthranilat-Synthetase (1), Anthranilat-5-phosphoribosyl-1-Pyrophosphat-Transferase (2), N-(5'-Phosphoribosyl)-Anthranilat-Isomerase (3), Indolglycerol-Phosphat-Synthetase (4)

und Tryptophan-Synthetase einem Multienzymkomplex an, der häufig sehr instabil ist und bereits während der Extraktion zerfällt.

### c) Biosynthese zum Phenylalanin und Tyrosin



Die Umlagerung der Chorisminsäure (CS) zur Prephenensäure (PS) wird durch das Enzym Chorismat-Mutase (1) katalysiert. Erhitzen im leicht Alkalischen hat die gleiche Wirkung. Durch Dehydratisierung (2) wird das Prephenat unter CO<sub>2</sub> Abspaltung zum Phenylpyruvat (PPS) umgewandelt, das durch reduktive Transaminierung (3) zur Aminosäure Phenylalanin umgesetzt wird.

Die Biosynthese des Tyrosins führt über eine Dehydrogenase-Reaktion (4) und CO<sub>2</sub> Abspaltung vom Prephenat zum 4-Hydroxyphenylpyruvat (HPPS) und wie oben über reduktive Transaminierung (5) zur Aminosäure Tyrosin.

## B. SCHLÜSSELENZYME

### a) DAHP-Synthetase

Endprodukte einer Biosynthese oder Substratvorläufer regulieren durch Änderung der Aktivität des ersten Enzyms eines Biosyntheseweges in der Regel den Kohlenstoffdurchsatz durch diesen. Liegen wie im Fall der Biosynthese der aromatischen Aminosäuren drei Endprodukte vor, so ist ein komplexerer Regulationsmechanismus erforderlich, wenn bei ungleichem Bedarf an diesen Produkten keine Anhäufung von Zwischen- oder Endprodukten erfolgen soll.

aa) Testbedingungen bei Blau- und Grünalgen

Es gelang erstmals bei Blau- und Grünalgen dieses Enzym nachzuweisen. Dabei zeigte sich, daß die spezifische Aktivität bei Extrakten der Blaualgen *Anacystis nidulans* und *Anabaena variabilis* etwa 20 %, bei den übrigen untersuchten Organismen (Blau- und Grünalgen) 10 % und weniger von der von *E.coli*, gezogen auf Minimalmedium, betrug. Es mußten daher 1 bis 2 mg Protein des Rohextrakts in den Enzymtest eingesetzt werden, um einen meßbaren Umsatz feststellen zu können. Eine zweite Schwierigkeit verursachten die hohen Mengen an Polysacchariden

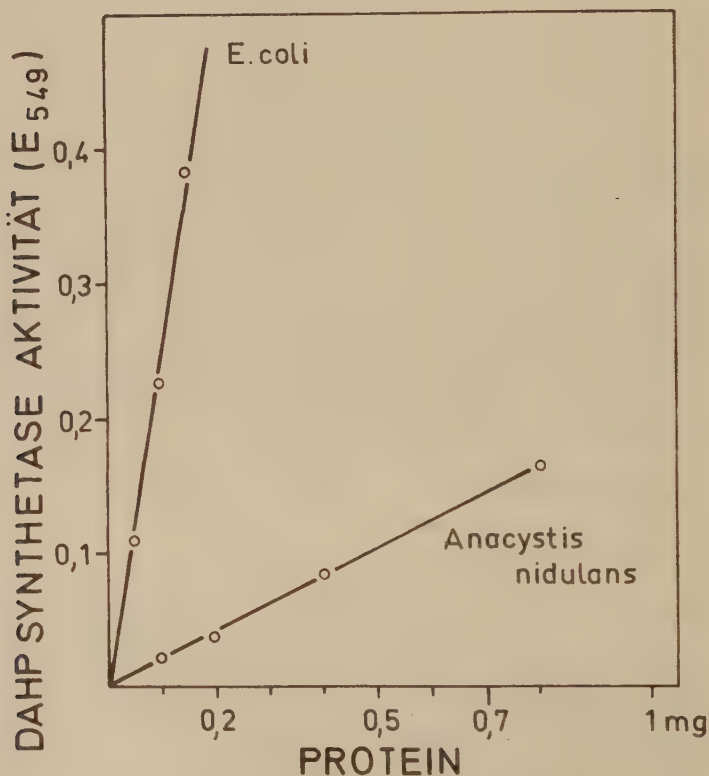


Abb. 5: Vergleich der spezifischen Aktivität der DAHP-Synthetase von *E.coli* K 12, gezogen auf Salzmedium und *Anacystis nidulans*, autotroph angezogen. Inkubation: 10 Min. bei 37°.

in den Extrakten der meisten Organismen, denn sie reagieren mit dem Perjodat-Thiobarbitursäure-Chromogen und überlagern die colorimetrische Bestimmung der DAHP, das bei diesem Nachweis ein Absorptionsmaximum bei 549 m $\mu$  zeigt. Überlagert die Reaktion von Polysacchariden die von DAHP, so verschiebt sich das Absorptionsmaximum in den Bereich zwischen 525 - 535 m $\mu$ . Erst nach Chromatographie auf Sephadex G 50 war ein Teil der störenden Zucker so weit abgetrennt, daß eindeutig enzymatische Aktivität im Extrakt nachgewiesen werden konnte. Abb. 6 zeigt das Spektrum der Produkte aus einem solchen DAHP-Nachweis, wenn Aliquote eines Extrakts von

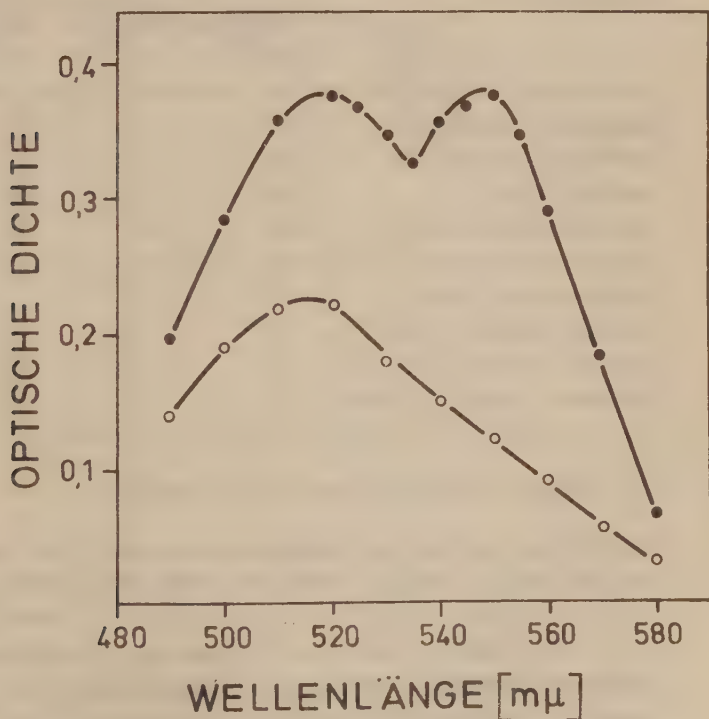


Abb. 6: Analyse von DAHP-Synthetase von 1,9 mg Rohextraktprotein von *Ankistrodesmus* nach Sephadex G 50 Filtration: Spektrum des vollständigen Reaktionsansatzes (●) und Ansatz ohne E4P und PEP (○).

Ankistrodesmus mit und ohne Substrat inkubiert werden. Die Differenz bei 549 m $\mu$  zwischen der Absorption des vollständigen Reaktionsansatzes und den Kontrollen wurde zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität verwendet.

Bei allen Organismen, die in Tabelle 2 aufgeführt sind, mit Ausnahme von *Anacystis nidulans* und *Anabaena variabilis*, wurden die Extrakte auf G 50 Sephadex chromatographiert. Diese Zusammenstellung gibt einen Überblick der Regulation der DAHP-Synthetase Aktivität in vitro bei einigen Blau- und Grünalgen.

Tab. 2: % Hemmung der DAHP-Synthetase Aktivität in vitro

| Organismus                     | Hemmerkonzentration  |                    |                    |                    |
|--------------------------------|----------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
|                                | L-Phenylalanin       |                    | L-Tyrosin          |                    |
|                                | 5x10 <sup>-3</sup> m | 10 <sup>-3</sup> m | 10 <sup>-4</sup> m | 10 <sup>-5</sup> m |
| <i>Anacystis nidulans</i>      | 32                   | 10                 | 80                 | 45                 |
| <i>Anabaena variabilis</i>     | 20                   | 10                 | 85                 | 50                 |
| <i>Nostoc spec.</i>            | 45                   | 30                 | 40                 | 10                 |
| <i>Oscillatoria spec.</i>      | 35                   | 30                 | 60                 | 10                 |
| <i>Maesotaenium spec.</i>      | 0                    | 0                  | 0                  | 0                  |
| <i>Ankistrodesmus spec.</i>    | 0                    | 0                  | 0                  | 0                  |
| <i>Euglena gracilis</i> (auto) | 74                   | 40                 | 90                 | 80                 |
| <i>Euglena gracilis</i> (mixo) | 72                   | 42                 | 90                 | 75                 |

#### ab) Wirkung von Effektoren bei Blaualgen

Neben den angeführten Hemmern wurde auch noch der Einfluß von Tryptophan (bis zu einer Konzentration von 10<sup>-4</sup> molar), von Prephenat und von Chorismat getestet, jedoch zeigten diese Substanzen keinerlei Wirkung auf die Aktivität der DAHP-Synthetase bei Blaualgen. Phenylalanin und Tyrosin hemmten die enzymatische Aktivität, wobei Tyrosin 100 bis 1000 mal wirksamer ist als Phenylalanin. Inkubiert man

Extrakte der angegebenen Blaualgen mit entsprechenden Konzentrationen beider negativer Effektoren, so erhielt man nie einen additiven Hemmeffekt, nur eine kumulative Wirkung war zu beobachten. Die DAHP-Synthetasen von *Anacystis* und *Anabaena* wurden näher untersucht; sie zeigen gegenüber beiden Hemmern fast identisches Verhalten. Die Wirkung von Phenylalanin scheint wenig spezifisch zu sein. Um dieses geringe sterische Unterscheidungsvermögen deutlich zu machen, wurden Hemmversuche mit p-Fluor-Phenylalanin und mit der in biologischen Systemen inaktiven D-Form des Tyrosins unternommen (Abb. 7).

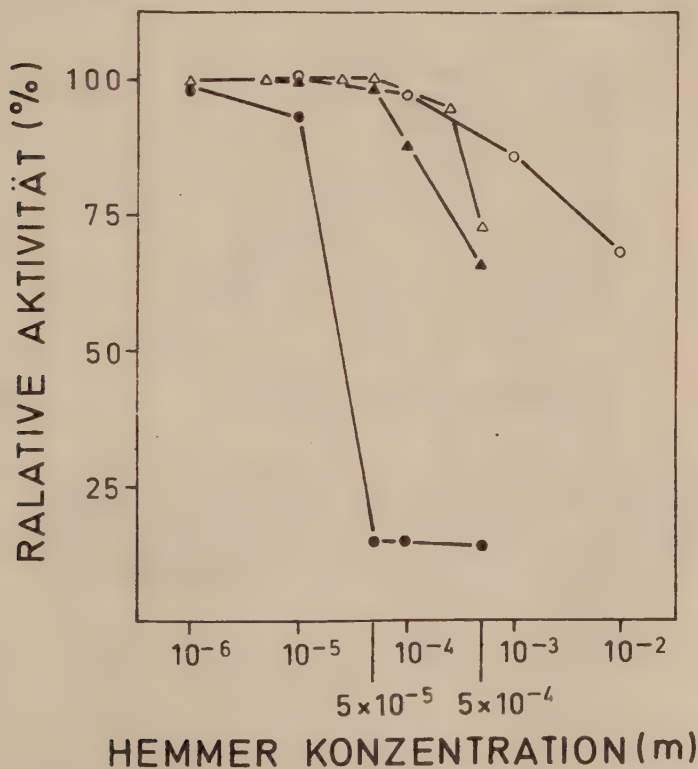


Abb. 7: Relative Hemmung der DAHP-Synthetase von *Anabaena* var. (1,82 mg Rohextrakt). (o) L-Tyrosin, (□) D-Tyrosin, (Δ) D,L-Fluor-Phenylalanin (Kurve für L-Isomer), (○) L-Phenylalanin.

Es zeigte sich, daß das in 4-Stellung fluorierte Phenylalanin und D-Tyrosin hemmender auf die Enzymaktivität wirken als L-Phenylalanin. Die Hemmung durch Phenylalanin scheint demnach durch eine geringe sterische Spezifität des allosterischen Ortes des Enzyms für Tyrosin verursacht zu sein.

ac) Nähere Charakterisierung des Enzyms von *Anacystis* und *Anabaena*

Bei der Untersuchung weiterer Eigenschaften der DAHP-Synthetase von *Anacystis* und *Anabaena* zeigte sich weitgehende Übereinstimmung. Beide Proteine gehören dem V-Typ allosterischer Enzyme an. Abb. 8 und Abb. 9 geben diesen Sachverhalt wieder.

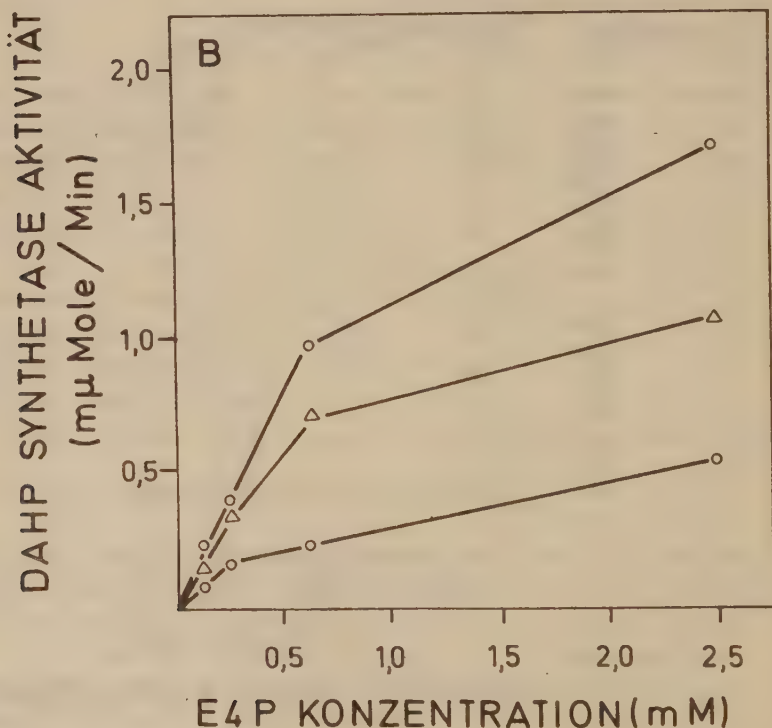


Abb. 8: E4P Konzentration aufgetragen gegen Geschwindigkeit. (1,78 mg Protein eines dialysierten Rohextraktes von *Anabaena*) (o) ohne Hemmer, ( $\Delta$ ) mit  $5 \times 10^{-6} \text{ M}$  L-Tyrosin, (o)  $2 \times 10^{-5} \text{ M}$  L-Tyrosin

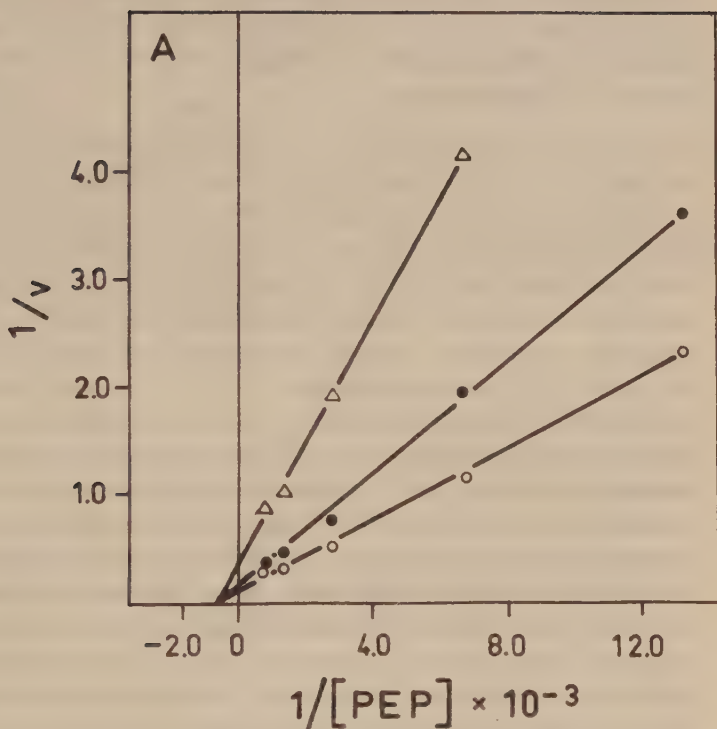


Abb. 9: Wirkung von Substratkonzentrationen auf die Anfangsgeschwindigkeit - Lineweaver-Burk Darstellung von PEP Konzentration und Geschwindigkeit (1,82 mg Protein eines dialysierten Rohextrakts von *Anacystis*). (o) ohne Hemmer, (●) mit  $5 \times 10^{-5}$  M L-Tyrosin, (Δ) mit  $10^{-5}$  M L-Tyrosin, Geschwindigkeit in  $\mu\text{Mole/Min}$ .

Wird die Enzymaktivität gegen die Substratkonzentration aufgetragen (nur für E4P angegeben), so ergeben sich für die verschiedenen Tyrosinkonzentrationen stets hyperbolische Kurven, die, wie die Kontrolle ohne Hemmer, durch den Nullpunkt laufen (Abb. 8); in der doppelt reziproken Darstellung belegt der eine Schnittpunkt mit der  $1/S$  Achse, daß die Affinität, unabhängig von der Anwesenheit und Konzentration des Hemmers, zum Substrat stets gleich bleibt; jedoch zeigen die

verschiedenen Schnittpunkte auf der  $1/V$  Achse, daß sich, abhängig von der Anwesenheit und Konzentration von L-Tyrosin, die enzymatische Umsatzgeschwindigkeit ändert (Abb. 9). Die DAHP-Synthetasen von *Anabaena* und *Anacystis* zeigen stets gleiche Affinität zu ihren beiden Substraten, unabhängig von der Anwesenheit irgend welcher Liganden; sie sind demnach V-Typ-Enzyme.

Der  $K_m$  für das Enzym ist, mit dem Rohextrakt ermittelt, bei *Anabaena* für beide Substrate gleich: er beträgt für E4P  $6,8 \times 10^{-4}$  und für PEP  $7,0 \times 10^{-4}$  (Durchschnittswert aus je drei Bestimmungen), in der gleichen Größenordnung liegen die Werte bei *Anacystis*. Unterschiedliches Verhalten zeigten die DAHP-Synthetasen der beiden Organismen in ihrer  $p_h$ -Abhängigkeit der Aktivität. Während das Enzym von *Anacystis* ein ausgeprägtes  $p_h$  Optimum zwischen  $p_h$  6,4 - 7,0 hat, arbeitet das Enzym bei *Anabaena* zwischen  $p_h$  6,4 - 8,0 etwa gleich gut. Das Temperaturoptimum der enzymatischen Reaktion des *Anabaena*-Extrakts liegt bei  $40^\circ\text{C}$ , der *Anacystis* Extrakt zeigte ein Optimum bei  $45^\circ\text{C}$ . Zugabe von p-Chloromercuribenzoat, ein bekanntes SH-Gruppen-Reagenz, zu Extrakten von *Anabaena* bewirkte eine Aktivitätssteigerung der DAHP-Synthetase zwischen  $10^{-7}$  und  $10^{-5}$  molar pCMB, während höhere Konzentrationen stark hemmten. Jedoch hatte dieser Effekt der Aktivitätssteigerung keinen nennenswerten Einfluß auf die allosterischen Eigenschaften des Enzyms, ebenso wie Mercaptoäthanol, das zwar in Konzentrationen über  $10^{-4}$  molar eine hemmende Wirkung auf die Enzymaktivität ausübt, jedoch den Effekt von Tyrosin und Phe - nylalanin auf die Enzymaktivität nicht beeinflusst. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß am allosterischen Ort SH-Gruppen nicht direkt an der Bindung der Effektoren beteiligt sind; der Effekt von pCMB läßt sich so deuten, daß das Reagenz die Struktur des Enzyms beeinflusst und möglicherweise in höheren Konzentrationen den Zugang zum katalytischen Ort verhindert. Weder pCMB noch Mercaptoäthanol haben einen merklichen Einfluß auf die DAHP-Synthetase bei *Anacystis nidulans*.

ad) Wirkung von Effektoren bei *Ankistrodesmus* und  
*Maesotaenium* (Grünalgen)

Dieses weitgehend einheitliche Bild der Regulation der DAHP-Synthetase Aktivität in vitro durch aromatische Aminosäuren bei Blaualgen konnte jedoch bei zwei Grünalgen, nämlich *Ankistrodesmus* sp. und *Maesotaenium* sp. nicht gefunden werden. Mit Ausnahme eines wahrscheinlich unspezifischen Effekts von Prephensäure (sie hemmte die Enzymaktivität in  $5 \times 10^{-4}$  molarer Lösung ca. zu 15 %) hatten weder die Endprodukte noch das Zwischenprodukt Chorisminsäure, weder alleine noch in allen möglichen Kombinationen miteinander, irgend einen Einfluß auf die Aktivität der DAHP-Synthetase.

ae) Wirkung von Effektoren bei *Euglena*

Es erscheint gerade deswegen interessant, an einem den Grünalgen verwandten Organismus, der sowohl autotroph wie auch heterotroph wachsen kann, die Regulation der DAHP-Synthetase Aktivität zu studieren. *Euglena gracilis* wurde gewählt, da die Art des Wachstums leicht durch Änderung der Bedingungen, unter denen sie gezogen wird, beeinflußt werden kann. Es zeigte sich jedoch, daß autotrophes oder heterotrophes Wachstum keinerlei Einfluß, weder auf die spezifische Aktivität noch auf die allosterischen Eigenschaften der DAHP-Synthetase ausübte (Tab. 2). Sehr geringe Hemmerkonzentrationen wirken bereits auf die Enzymaktivität; 50 % Hemmung wird bei einer Tyrosinkonzentration von nur  $4 \times 10^{-6}$  molar erreicht (Abb.10). Der gleiche Effekt tritt mit Phenylalanin mit der 200fachen Konzentration ein. Ebenso wie bei den Blaualgen wurde p-Fluor-Phenylalanin, ein Phenylalaninanalogue, auf seine Wirkung getestet. Es hemmt 20 mal besser als Phenylalanin und zeigt in dieser Hinsicht mehr Ähnlichkeit mit Tyrosin als Phenylalanin. D-Tyrosin, die biologisch inaktive Form dieser Aminosäure, hemmt genauso wie Phenylalanin (in Abb. 10 nicht angegeben), so daß auch hier, wie bei den Blaualgen der Schluß naheliegt, daß die Hemmung durch Phenylalanin durch das geringe sterische Unterscheidungsvermögen des Enzyms bewirkt wird. Tryptophan ist ohne jeden Einfluß auf die Enzymaktivität. Diese

Befunde deuten darauf hin, daß wir es bei *Euglena* nur mit einer DAHP-Synthetase zu tun haben. Einmal wäre bei Vorhanden sein von Isoenzymen ein durch Tyrosin und ein durch Phenylalanin hemmbares Enzym zu fordern und damit mit jedem negativen Effektor nur eine bestimmte, maximale Teilhemmung möglich; die Enzymaktivität läßt sich jedoch mit Tyrosin zu über 90 % und mit Phenylalanin zu etwa 80 % hemmen. Zum anderen wäre bei Zugabe der zwei Hemmer bei Gegenwart von Isozymen ein additiver Hemmeffekt zu erwarten, aber entsprechende Konzentrationen von Tyrosin plus Phenylalanin wirken nur kumulativ hemmend.

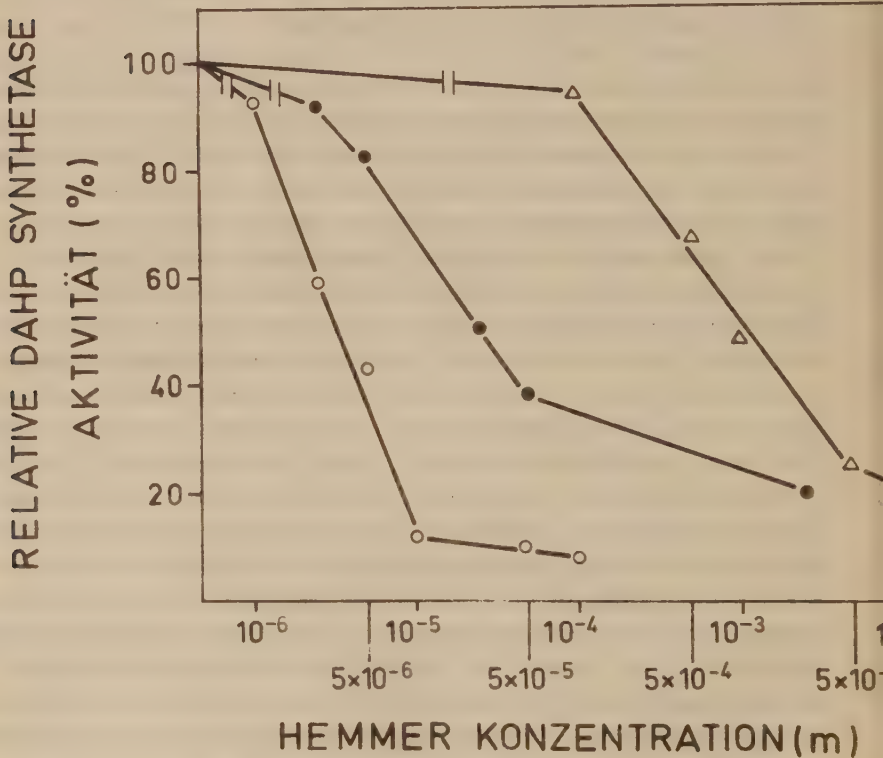


Abb. 10: Relative Hemmung der DAHP-Synthetase von *Euglena* (1,76 mg Protein des makromolekularen Peak einer Sephadex G 50 Filtration) durch L-Tyrosin (o), L-Phenylalanin (Δ) und D.L-p-Fluor-Phenylalanin (●) (Kurve für das L-Isomer gezeichnet); der Organismus wurde autotroph gezogen.

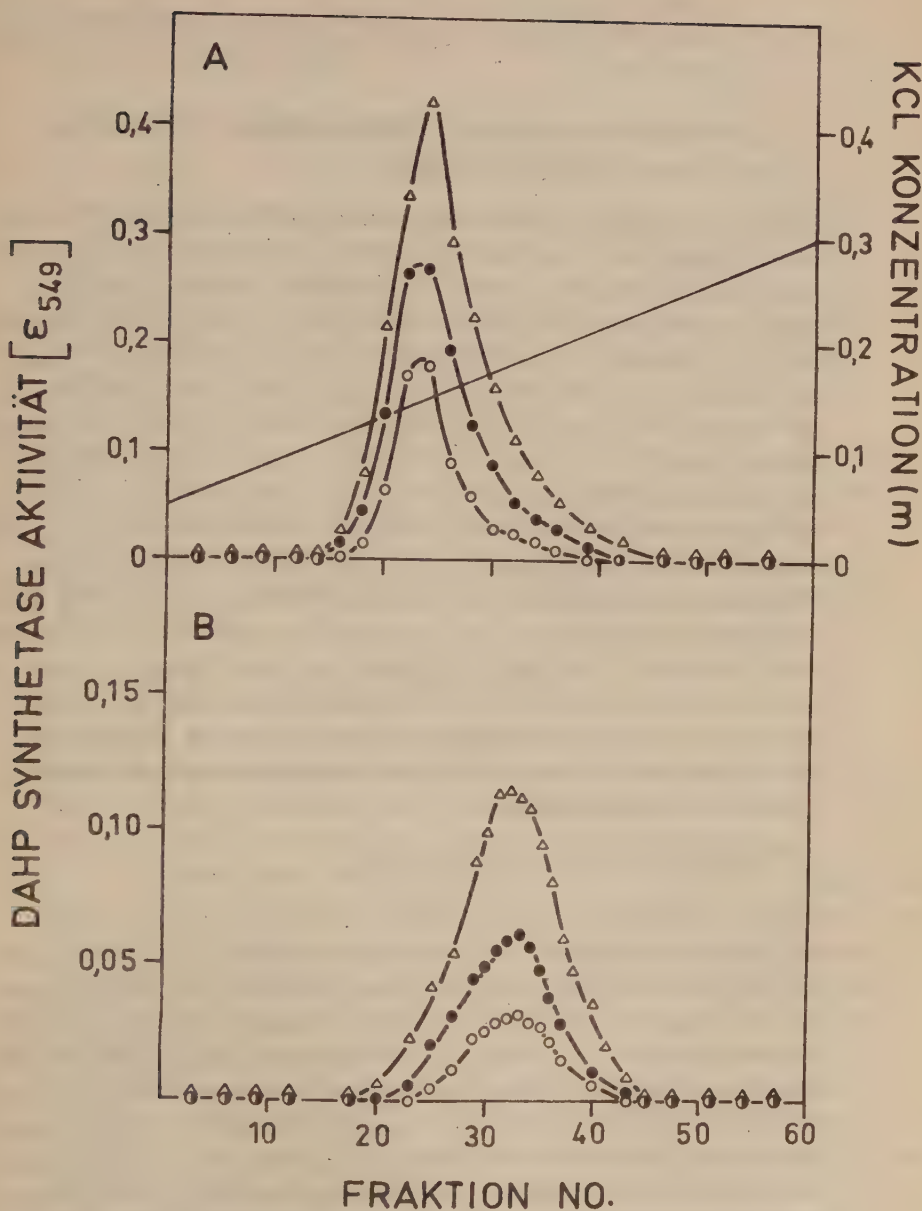


Abb. 11: Reinigung der DAHP-Synthetase von *Euglena gracilis*.  
 A. DEAE-Cellulose Chromatographie. 400 mg Protein Roh-extrakt wurden aufgetragen.  
 B. Sephadex G 200 Gel-Chromatographie. Gipfelfraktion von Abb. 11.A wurde aufgetragen. Der Stamm wurde

mixotroph gezogen. Die DAHP-Synthetase Aktivität von 0,3 ml Aliquote jeder Fraktion wurde ohne Hemmer ( $\Delta$ ) mit  $10^{-3}$  m L-Phenylalanin ( $\bullet$ ) und mit  $10^{-5}$  m L-Tyrosin bestimmt.

#### af) Versuch zur Trennung der DAHP-Synthetase von Euglena nach Ladung und Molekülgröße

Um diese mehr indirekten Befunde weiter zu erhärten, wurden 400 mg Rohextrakt von Euglena auf eine DEAE-Cellulose-Säule aufgetragen und mit 0,05 - 0,3 molar KCl eluiert. Abb. 11 zeigt, daß sowohl die DAHP-Synthetase, gehemmt durch Tyrosin, wie die, gehemmt durch Phenylalanin, in einem Gipfel liegen. Die Fraktion mit der höchsten enzymatischen Aktivität wurde auf eine G 200 Sephadex Gel Säule aufgetragen und chromatographiert. Wie aus der Abb. 11 B ersichtlich, erschien wieder ein gemeinsamer Peak, sowohl für die durch Tyrosin, als auch für die durch Phenylalanin gehemmte DAHP-Synthetase Aktivität. Dieses gleiche Verhalten, sowohl auf dem Ionenaustauscher (Trennung nach Ladung), wie auch auf Sephadex G 200 Gel (Trennung nach Molekülgröße) ist ein weiterer Hinweis, daß nur ein Enzym vorliegt. Der Aktivitätspeak bei der Chromatographie mit der geeichten Sephadex G 200 Gel Säule erschien bei einer Position, die dem Molekulargewicht von 130 000 entspricht. Die Spitzenfraktionen nach diesem Reinigungsschritt waren etwa 40fach angereichert.

#### ag) Untersuchungen zur Repression . . . . .

Repressionsuntersuchungen wurden an Anacystis und Euglena Kulturen durchgeführt. Diese Stämme wurden in Gegenwart von  $10^{-3}$  molaren Konzentrationen jeder aromatischen Aminosäuren und zur Kontrolle mit allen dreien zusammen gezogen; jedoch zeigte sich keine Wirkung auf die spezifische Aktivität der DAHP-Synthetase in diesen Organismen. Man kann aber aus diesem Befund nicht darauf schließen, daß überhaupt keine Kontrolle der Enzymsynthese stattfindet, denn es ist möglich, daß während des Wachstums ein bereits maximal reprimierter Enzymspiegel vorliegt. Nur multiple, aromatische Aminosäuren

auxotrophe Mutanten könnten weiterhelfen, dieses Problem näher zu untersuchen.

#### ah) Aminosäuremangelmutanten von Ankistrodesmus

Eine Methode zur Herstellung und Isolierung solcher amino-säureauxotropher Mutanten bei der Grünalge Ankistrodesmus wurde entwickelt. Dieser Organismus wurde deshalb gewählt, weil er einmal gegenüber Anacystis den Vorteil besitzt, Glucose als Kohlenstoffquelle gut zu verwerten und somit Mutationen, die die Energieversorgung des Organismus ausschalten, überspielt werden können und zum zweiten, weil Ankistrodesmus mit viel höheren Dosen des Mutagens wie Euglena behandelt werden kann, ohne daß der oft beschriebene Bleicheffekt eintritt. Von den isolierten Mutanten war der Großteil auxotroph für Arginin oder Arginin plus Histidin. Die Analyse der Mutanten ist noch nicht abgeschlossen; eine wird zur Zeit genauer auf die Regulation der Argininsynthese untersucht.

#### ai) Versuche zur in vivo Regulation

Wenn das in vitro gefundene Regulationsmuster auch in vivo gleichermaßen funktioniert, so wäre zu erwarten, daß bei Zugabe von extrazellulärem Tyrosin die DAHP-Synthetase gehemmt wird. Dies würde zu einem Tryptophan- und Phenylalaninmangel führen. Die Proteinbiosynthese käme zum Erliegen. Um dies zu prüfen wurden zu verschiedenen Ansätzen 6 Stunden nach dem Animpfen Tyrosin, Phenylalanin oder Tryptophan (40 ug/ml) oder alle drei Aminosäuren zugegeben. Angezogen wurden die Anacystiskulturen unter Dauerlicht und ständigem Schütteln bei 41°C (Wachstumsoptimum) in 200 ml Erlenmeyerkolben mit 30 ml Salzmedium und 0,02 uC/ml  $^{14}\text{C}$  L-Leucin. (In einem Vorversuch war festgestellt worden, daß Anacystis unter gleichen Bedingungen  $^{14}\text{C}$ -Tyrosin annähernd so gut wie  $^{14}\text{C}$ -Leucin aufnimmt.) Die Auswertung dieses Versuchs zeigte bei allen drei aromatischen Aminosäuren wie bei den Kontrollen (mit allen drei arom. Aminosäuren und ohne diese) gleiche Einbauraten an  $^{14}\text{C}$ -Leucin. Das bedeutet,

daß z. B. extrazelluläres Tyrosin die Aktivität der DAHP-Synthetase nicht soweit senkt, daß eine Verarmung an den anderen Endprodukten dieses Biosynthesewegs eintritt. Entsprechendes gilt ebenso für Phenylalanin.

#### b) Chorismat-Mutase

Eine effektive Regulierung eines verzweigten Biosynthesewegs kann nicht stattfinden, wenn die Aktivität des ersten Enzyms, wie im Fall der DAHP-Synthetase der untersuchten Organismen, nur durch das Niveau eines Endprodukts reguliert wird (Ankistrodesmus und Maesotaenium keine Regulation). Ein solcher Ein-Effektor-Kontrollmechanismus kann jedoch durchaus wirksam sein, wenn eine Koordinierung der Aktivitäten der Enzyme an den Verzweigungsstellen des Biosyntheseweges stattfindet. In einem solchen Fall tritt dann solange keine Feedbackhemmung des ersten Enzyms im gemeinsamen Biosyntheseweg ein, bis die Pegel der anderen Produkte dieses Synthesewegs genügend hoch sind.

Das letzte Zwischenprodukt im gemeinsamen Syntheseweg der aromatischen Aminosäuren ist die Chorisminsäure. Sie stellt das Substrat für die Anthranilat-Synthetase (Tryptophan) und die Chorismat-Mutase (Phenylalanin und Tyrosin) dar. An diesem Punkt müßte die Regulation eingreifen, wenn nach dem obengeschilderten Mechanismus bei den untersuchten Organismen reguliert wird.

#### ba) Wirkung der Effektoren auf die Chorismat-Mutase Aktivität bei Grünalgen und Euglena

Die Testbedingungen für die Chorismat-Mutase wurden an Euglen Rohextrakten erarbeitet. Der günstige  $p_H$  Bereich liegt zwischen 7,5 - 8,2. Die enzymatische Reaktion ist bei einer Inkubationstemperatur von 30°C über 40 Minuten linear. Bei Versuchen mit Euglena Extrakten zeigte sich, daß sowohl L-Phenylalanin als auch L-Tyrosin die Aktivität der Chorismat-Mutase stark und im gleichen Konzentrationsbereich hemmen (Abb. 12). Die Zugabe von L-Tryptophan bewirkt eine leichte, aber signifikante

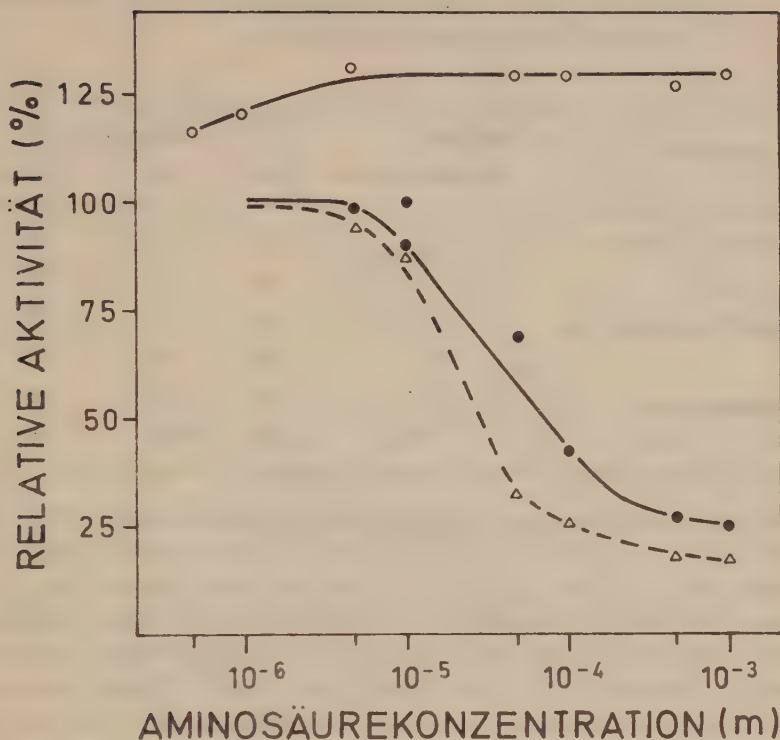


Abb. 12: Wirkung der Endprodukte auf die Chorismat-Mutase Aktivität eines dialysierten Rohextrakts von *Euglena*. Die Enzymaktivität ohne Effektor wurde als 100 % angenommen (= 1,26  $\mu$ Mole Prephenat/h/mg Protein). (o) Tryptophan, ( $\Delta$ ) Phenylalanin, (●) Tyrosin

Aktivitätssteigerung des Enzyms. Dieses Verhalten kann mit der Gegenwart von zwei Isoenzymen erklärt werden, wobei eines durch Phenylalanin, das andere durch Tyrosin hemmbar ist; dagegen spricht jedoch folgender Befund: jeder der beiden Hemmer kann die Aktivität der Chorismat Mutase zu etwa 80 % im Rohextrakt hemmen und die beiden negativen Effektoren zusammen verursachen nur einen kumulativen Hemmeffekt, wie aus Tab. 3 hervorgeht.

Tab. 3: Nicht-additive Hemmung durch Tyrosin und Phenylalanin der Chorismat-Mutase Aktivität

| Organismus                | Hemmer<br>Konzentration | % Hemmung |     |           |
|---------------------------|-------------------------|-----------|-----|-----------|
|                           |                         | Tyr       | Phe | Tyr + Phe |
| <i>Euglena gracilis</i>   | $2 \times 10^{-5}$      | 32        | 36  | 51        |
|                           | $7,5 \times 10^{-5}$    | 52        | 68  | 88        |
| <i>Ankistrodesmus</i> sp. | $5 \times 10^{-4}$      | 55        | 45  | 66        |
|                           | $10^{-3}$               | 69        | 56  | 74        |
| <i>Zygnema</i> sp.        | $5 \times 10^{-5}$      | 32        | 20  | 33        |
|                           | $10^{-4}$               | 50        | 33  | 52        |

Die Ergebnisse zeigen, daß der theoretisch additive Wert der einzelnen Effekte viel höher liegt als der experimentelle Befund. Beide Effektoren scheinen am gleichen Protein zu wirken. Die Untersuchungen wurden auch auf die beiden Grünalgen *Ankistrodesmus spec.* und *Zygnema spec.* ausgedehnt. Wie Abb. 13 zeigt, verhalten sich die Chorismat-Mutasen dieser Organismen im Prinzip ähnlich wie die von *Euglena*. Die spezifische Aktivität ist bei *Ankistrodesmus spec.* etwa nur  $1/3$ , bei *Zygnema spec.* nur  $1/4$  so hoch wie bei *Euglena*.

#### bb) Kompensation der Hemmeffekte durch Tryptophan

Tryptophan wirkt als positiver Effektor der Chorismat-Mutase, selbst bei  $10^{-3}$  molarer, also sättigender, Hemmerkonzentration, gleichgültig ob mit Hemmer oder mit Aktivator vorinkubiert wird. Ein weiterer Versuch stützt diesen Befund und gibt Aufschluß über die Wirkung verschiedener Konzentrationen von Hemmer und Aktivator auf die Enzymaktivität. Abb. 14 gibt einen solchen Versuch wieder. *Euglena* Rohextrakte wurden ohne das Enzymsubstrat einmal 5 Minuten bei  $30^{\circ}\text{C}$  mit verschiedenen Konzentrationen (von  $2 \times 10^{-4}$  molar bis  $2 \times 10^{-7}$  molar) Tryptophan vorinkubiert, dann Chorisminsäure und  $10^{-3}$  molar Phenylalanin bzw. Tyrosin

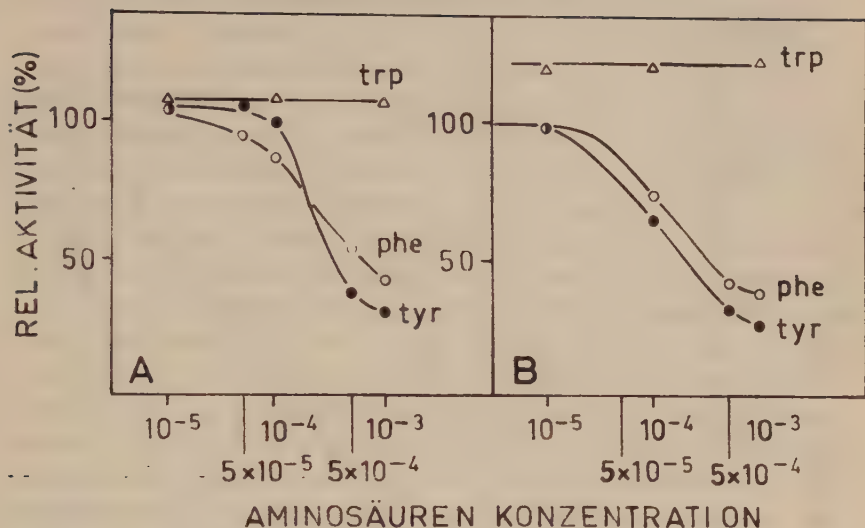


Abb. 13: Wirkung der Endprodukte auf die Aktivität der Choris-mat-Mutase dialysierter Rohextrakte von A. Ankistrodesmus spec. und B. Zygnema spec. Die Enzymaktivität ohne Effektor wurde als 100 % genommen (Ankistrodesmus 0,431 und Zygnema 0,287  $\mu$ Mole Prephenat gebildet/h/mg Protein).

zugegeben, das Testgemisch mit Substrat weitere 30 Minuten inkubiert und der enzymatische Umsatz gemessen. Im Gegenversuch wurde entsprechend mit  $2 \times 10^{-3}$  molarer Tyrosin- bzw. Phenylalaninkonzentration vorinkubiert und ebenso Substrat und diesmal Tryptophan in Konzentrationen von  $10^{-4}$  bis  $10^{-7}$  molar zugegeben (dabei verdünnte sich der Effektor der Präinkubation auf die Hälfte). Durch Bestimmung der enzymatischen Aktivität wurde dabei jene Konzentration an Aktivator ermittelt, die in der Lage ist, die Hemmwirkung des vorgegebenen Effektors vollständig aufzuheben. Es zeigte sich, daß unabhängig davon, ob mit Hemmer oder Aktivator vorinkubiert wurde, die Hemmwirkung von  $10^{-3}$  molar Tyrosin (Vorinkubation  $2 \times 10^{-3}$  molar) durch  $6-10 \times 10^{-6}$  molar Tryptophan (Schwankungsbreite der Versuche) und die Hemmwirkung von  $10^{-3}$  molar Phenylalanin

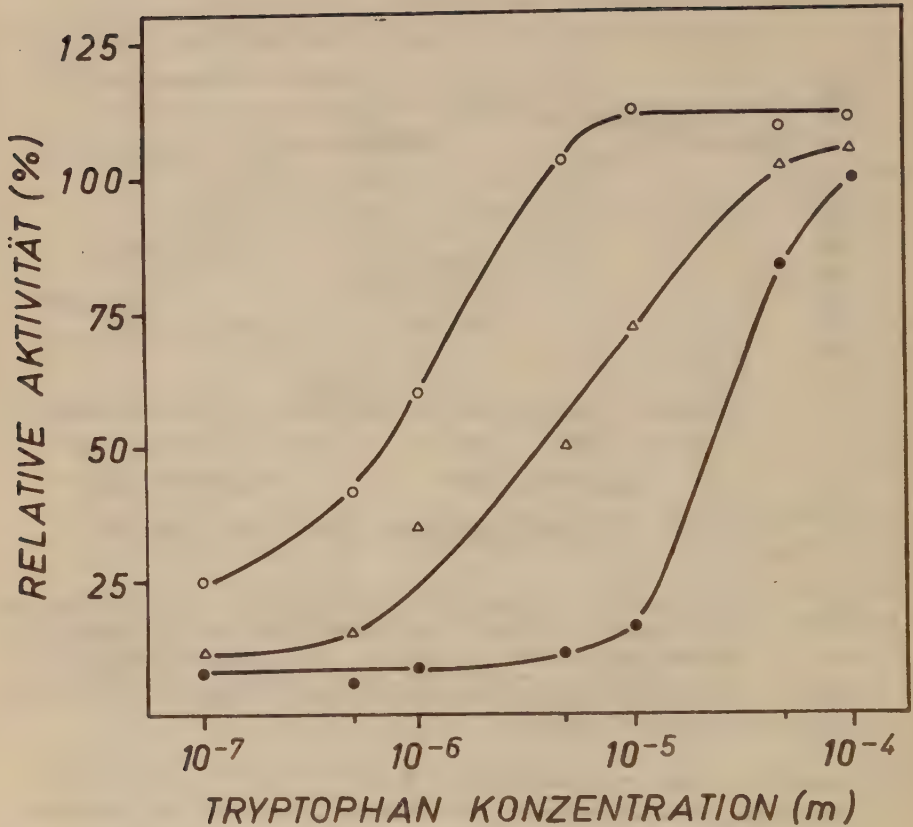


Abb. 14: Aufhebung der Feedback-Hemmung der Chorismat-Mutase Aktivität durch verschiedene Tryptophankonzentrationen. Vor Inkubation des Enzymtestes in Gegenwart von Tryptophan (und Substrat) mit den angegebenen Konzentrationen, wurde der Extrakt 5 Min. bei  $30^{\circ}$  vorinkubiert in Gegenwart von  $2 \times 10^{-5}$  m L-Tyrosin (○),  $2 \times 10^{-5}$  m L-Phenylalanin (△) oder  $10^{-5}$  m L-Tyrosin und  $10^{-5}$  m L-Phenylalanin zusammen (●). Die spezifische Aktivität ohne Zusatz (= 100 % Wert) war 1,15  $\mu$ Mole Prephenat/h/mg Protein.

durch  $5 \times 10^{-5}$  molar Tryptophan aufgehoben wird. Um die Hemmung durch L-Phenylalanin aufzuheben, ist etwa die 7 bis 10fache

Konzentration notwendig, die zur Beseitigung des Hemmeffekts durch L-Tyrosin erforderlich ist. Gibt man sowohl L-Phenylalanin wie L-Tyrosin in je  $10^{-3}$  molarer Konzentration (Vorinkubation) zu, so erhält man, wie aus Abb. 14 ersichtlich ist, nicht eine Kurve die zwischen der für L-Tyrosin und L-Phenylalanin liegt, sondern es zeigt sich, daß eine viel höhere Tryptophankonzentration zur Beseitigung des Hemmeffekts notwendig ist als in Gegenwart eines Hemmers alleine (es liegen gleiche Mengen an negativen Effektor (-en) vor). Dieses Verhalten und die Tatsache, daß verschiedene Aktivatorkonzentrationen zur Aufhebung des Hemmeffekts durch Tyrosin und Phenylalanin erforderlich sind, macht wahrscheinlich, daß das Enzym verschiedene allosterische Orte für Phenylalanin und Tyrosin besitzt. Die Chorismat-Mutase gehört im Gegensatz zur DAHP-Synthetase bei diesen Organismen, zum K-Typ der allosterischen Enzyme (Monod et al. 1965), also jenen, die zwar mit gleicher Geschwindigkeit bei Zugabe eines Effektors ihr Substrat umsetzen, doch die Affinität zu diesem ändern.

Nach den Untersuchungen an den Extrakten der zu den Euglenophyten zählenden *Euglena gracilis*, der zu den Conjugatophyceen zugehörigen *Zygnema spec.* und dem zu den Chlorococcales zuzurechnenden *Ankistrodesmus spec.* wurde noch ein weiterer Organismus, der ebenso zu den Grünalgen gehört (wenn man den Euglenophyten keine eigene Abteilung einräumt), nämlich *Chlamydomonas reinhardtii*, der den Volvocales zuzuordnen ist, auf die Regulierbarkeit der Chorismat-Mutase untersucht. Auch für diesen Organismus bestätigten sich die an den anderen Versuchsobjekten erzielten Ergebnisse; allerdings ist die Hemmwirkung auf die Enzymaktivität von Phenylalanin sehr gering ( $10^{-3}$  molar ergibt etwa 20 % Hemmung), auch die von Tyrosin erreicht in  $10^{-3}$  molarer Konzentration nur etwa 50 % Aktivitätshemmung. Tryptophan wirkt aber auch hier als Aktivator und beseitigt, unabhängig ob vor oder nach Einwirken der negativen Effektoren auf den zellfreien Extrakt, deren Wirkung gänzlich. Die spezifische Aktivität erreichte mit 0,94  $\mu$ Mole Prephenat gebildet/h/mg Protein fast den Wert von *Euglena*.

Tab. 4: Vergleich der allosterischen Eigenschaften der Chorismat-Mutase Aktivität in verschiedenen Algen

| Organismen     | Effektor                                      | Chorismat-Mutase<br>spez. Aktivität |
|----------------|-----------------------------------------------|-------------------------------------|
| Anacystis      | keiner                                        | 0,96                                |
|                | $5 \times 10^{-4} \text{ m Tyr}$              | 0,95                                |
|                | $5 \times 10^{-4} \text{ m Phe}$              | 0,98                                |
|                | $10^{-3} \text{ m Trp}$                       | 0,92                                |
| Chlamydomonas  | keiner                                        | 1,05                                |
|                | $5 \times 10^{-4} \text{ m Trp}$              | 1,02                                |
|                | $5 \times 10^{-4} \text{ m Tyr}$              | 0,56                                |
|                | $5 \times 10^{-4} \text{ m Tyr} + \text{Trp}$ | 1,06                                |
|                | $5 \times 10^{-4} \text{ m Phe}$              | 0,83                                |
|                | $5 \times 10^{-4} \text{ m Phe} + \text{Trp}$ | 1,0                                 |
| Ankistrodesmus | keiner                                        | 0,42                                |
|                | $5 \times 10^{-4} \text{ m}$                  | 0,48                                |
|                | $5 \times 10^{-4} \text{ m Tyr}$              | 0,18                                |
|                | $5 \times 10^{-4} \text{ m Tyr} + \text{Trp}$ | 0,47                                |
|                | $5 \times 10^{-4} \text{ m Phe}$              | 0,24                                |
|                | $5 \times 10^{-4} \text{ m Phe} + \text{Trp}$ | 0,48                                |
| Zygnema        | keiner                                        | 0,14                                |
|                | $5 \times 10^{-4} \text{ m Trp}$              | 0,22                                |
|                | $5 \times 10^{-4} \text{ m Tyr}$              | 0,05                                |
|                | $5 \times 10^{-4} \text{ m Tyr} + \text{Trp}$ | 0,23                                |
|                | $5 \times 10^{-4} \text{ m Phe}$              | 0,03                                |
|                | $5 \times 10^{-4} \text{ m Phe} + \text{Trp}$ | 0,27                                |

Die spezifische Aktivität der Chorismat-Mutase ist ausgedrückt als  $\mu\text{Mole Prephenat gebildet/h/mg Protein}$ .

### bc) Wirkung der Effektoren auf die Enzymaktivität bei *Anacystis*

Schließlich wurde auch noch der zellfreie Extrakt der Blaualge *Anacystis nidulans* auf Hemm- bzw. Aktivierbarkeit durch die entsprechenden Effektoren untersucht. Jedoch zeigten die drei Endprodukte des aromatischen Biosynthesewegs keinerlei Einfluß auf die Regulation der Chorismat-Mutase Aktivität (Tab. 4). Die spezifische Aktivität ist auch hier, im Vergleich zu *Zygnema* und *Ankistrodesmus*, mit 0,75  $\mu\text{Mol}$  Prephenat gebildet/h/mg Protein relativ hoch. Tab. 4 gibt eine Übersicht der allosterischen Eigenschaften der Chorismat-Mutase-Aktivität in verschiedenen Algen.

### c) Anthranilat-Synthetase

Das Enzym, das den Kohlenstofffluß im aromatischen Biosyntheseweg zur Synthese des Tryptophans hinleitet ist die Anthranilat-Synthetase. Wie bereits früher dargelegt, erscheint, wenn eine Regulation der Enzymaktivität in dieser unverzweigten Biosyntheseroute stattfindet, sie nur sinnvoll, falls die enzymatische Aktivität des ersten Enzyms (Anthranilat-Synthetase) verändert werden kann. Die erzielten Ergebnisse an den verschiedenen Organismen sind so einheitlich, daß nur das Beispiel der Regulation der Anthranilat-Synthetase-Aktivität von *Euglena gracilis* näher beschrieben werden soll. Abb. 15 gibt den Einfluß der 3 aromatischen Aminosäuren auf die Enzymaktivität wieder. Tryptophan wirkt als Feedbackhemmer und verhindert so bei ausreichender Konzentration seine weitere Synthese. Tyrosin und Phenylalanin sind ohne jeden Einfluß auf die Anthranilat-Synthetase-Aktivität *in vitro*. Bei allen untersuchten Organismen ergab sich nur eine graduelle Verschiebung der Hemmwirkung des Tryptophans wie aus Tab. 5 zu entnehmen ist. Verschiebt man die in Fig. 15 gezeigte Kurve entsprechend in den Bereich höherer oder niedriger Konzentration, so entspricht dieser Verlauf den bei *Ankistrodesmus*, *Zygnema*, *Chlamydomonas* und *Anacystis* erhaltenen Tryptophanhemmkurven. Bei all diesen Organismen wirken Phenylalanin und Tyrosin nicht als Effektoren der

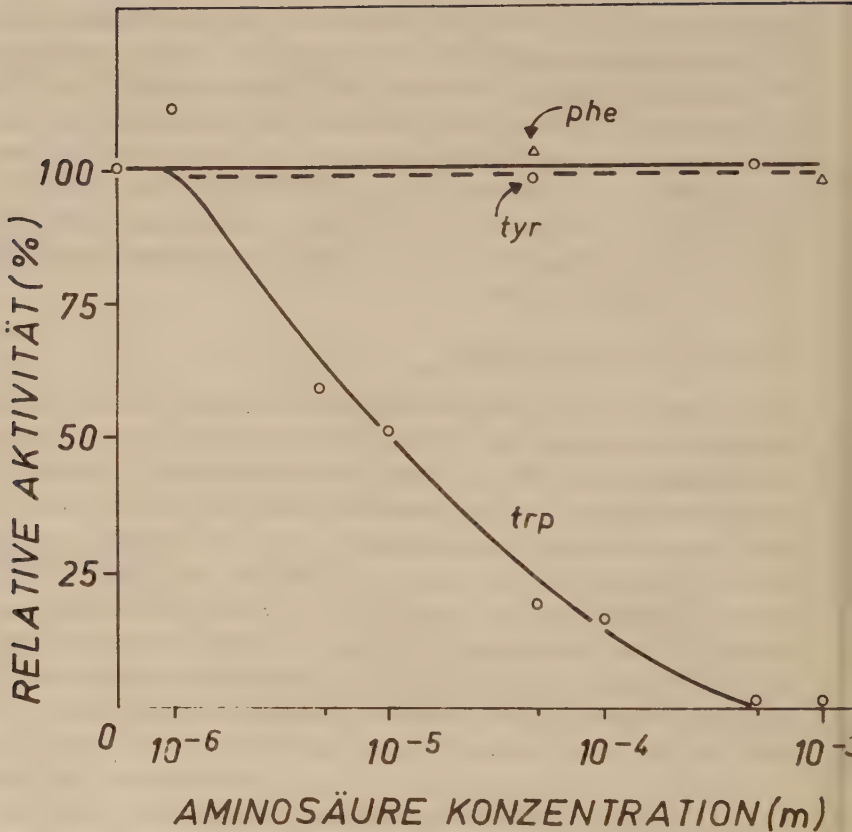


Abb. 15: Wirkung der aromatischen Aminosäuren auf die Anthranilat-Synthetase-Aktivität von dialysiertem *Euglena* Rohextrakt. Der 100 % Wert entspricht einer spezifischen Aktivität von  $0,03 \mu\text{Mol}$  Anthranilat gebildet/h/mg Protein.

Enzymaktivität. Auffällig ist nur das Verhalten von Extrakt von *Anacystis*, in denen totale Hemmung der Anthranilat-Synthetase-Aktivität bei  $5 \times 10^{-5}$  molar Tryptophan, und halbmaximale Hemmung bereits bei  $1,6 \times 10^{-6}$  molarer Effekorkonzentration eintritt.

Tab. 5: Hemmung der Anthranilat-Synthetase-Aktivität durch L-Tryptophan in verschiedenen Algen

| Organismen                       | 50 % Hemmung bei einer Tryptophankonz. von (m) |
|----------------------------------|------------------------------------------------|
| <i>Anacystis nidulans</i>        | $1,6 \times 10^{-6}$                           |
| <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> | $1,3 \times 10^{-4}$                           |
| <i>Euglena gracilis</i>          | $10^{-5}$                                      |
| <i>Ankistrodesmus spec.</i>      | $1,4 \times 10^{-4}$                           |
| <i>Zygnema spec.</i>             | $4,2 \times 10^{-3}$                           |

## 2. Reinigung der Chorismat-Mutase aus *Euglena gracilis*

Während der Untersuchungen der Regulation der Chorismat-Mutase-Aktivität von *Euglena gracilis* verdichteten sich die Hinweise, daß es sich hier um ein Enzym mit zwei negativen und einem positiven Effektor handelt. Eine Aufklärung, ob es sich tatsächlich um nur ein Protein handelt, läßt sich durch entsprechende Anreicherung erbringen.

### A. REINIGUNGSVERSUCHE BEI ANDEREN ORGANISMEN

An *E. coli* W (Pittard 1966) und *Aerobacter aerogenes* (Cotten und Gibson 1965) wurden zwei Chorismat-Mutasen durch Chromatographie des Zellextrakts auf DEAE-Cellulose nachgewiesen. Genetische Befunde sprechen zwar bei *Neurospora crassa* (Baker 1968) für das Vorhandensein von nur einer Chorismat-Mutase, doch die Tatsache, daß sich bei Chromatographie auf Cellulose nur ein Peak mit entsprechender Enzymaktivität (Baker 1966) fand, ist biochemisch wohl noch kein ausreichender Beweis. Baker erreichte mit seiner aktivsten Präparation eine Anreicherung gegenüber dem Rohextrakt von nicht ganz fünffach.

Auch Cotton und Gibson (1968) geben aus dem gleichen Grund wie Baker für *Pisum sativum* eine Chorismat-Mutase an, allerdings hat das Enzym während der "Reinigungsprozedur" auf DEAE-Cellulose einen Großteil seiner Aktivität (83 % !) eingebüßt. Liggins et al. (1967) gelang bei *Claviceps paspali* trotz DEAE-Cellulose-Chromatographie erst nach etwa 200facher Anreicherung mit trägerfreier Elektrophorese zwei Isoenzyme bei diesem Organismus wahrscheinlich zu machen. Schmitt und Zalkin (1969) konnten bei *Salmonella typhimurium* eine der beiden Chorismat-Mutasen, die mit Prephenat Dehydratase in einem Enzymkomplex vorliegt, etwa 70fach anreichern. Die anderen Autoren, die sich bisher mit diesem Enzym beschäftigten, erreichten in der Regel nur eine 5 - 10fache Anreicherung.

## B. REINIGUNG DES ENZYMS VON EUGLENA

Ziel der Reinigung der Chorismat-Mutase von *Euglena gracilis* war es, das Enzym so schonend anzureichern, daß alle allosterischen Eigenschaften, die aus Versuchen mit Rohextrakten bekannt waren, auch in der gereinigten Präparation in gleicher Weise erhalten bleiben. Daher mußte auf die Chromatographie auf DEAE-Cellulose verzichtet werden, denn das Enzym büßte bei dieser Prozedur selbst mit dem schonensten Austauscher (alle üblichen Celluloseaustauscher wurden getestet) etwa 80 % der Aktivität ein und verlor seine allosterischen Eigenschaften in den physiologischen Konzentrationsbereichen der Effektoren (Effekte anderer Autoren mit  $10^{-3}$  molaren und höheren Konzentrationen liegen wohl außerhalb dieses Bereiches).

Nach jedem Anreicherungsschritt wurde die Aktivität des Enzyms, seine Hemm- und Aktivierbarkeit (= Aufhebung des Hemmeffekts) getestet. Die Wirksamkeit der Effektoren war nicht nach jedem Reinigungsschritt gleich. Es konnte aber mit hoch angereichertem Enzym (2930fach) nachgewiesen werden, daß nicht das Enzym mit seinen Eigenschaften während der Anreicherung einer Veränderung unterworfen war, sondern daß das geänderte Verhalten auf Veränderung des  $p_H$  Wertes bei den verschiedenen Reinigungsstufen zurückzuführen ist (siehe allosterische Eigenschaften

der Chorismat Mutase). Während aller Reinigungsstufen traten die enzymatische Aktivität, ihre Hemmbarkeit durch die negativen Effektoren und die Aktivierbarkeit durch Tryptophan stets in den gleichen Fraktionen auf. Nach etwa 200fachen Anreicherungen wurden Untersuchungen auf einen Multienzymkomplex durchgeführt. Weder DAHP-Synthetase, noch Anthranilat-Synthetasen noch Prephenat-Dehydrogenase, noch Prephenat Dehydratase Aktivität konnte in den Fraktionen mit Chorismat-Mutase Aktivität nachgewiesen werden. Tab. 6 gibt die Daten einer typischen Reinigung, ausgehend von ca. 60 Liter einer mixotroph gezogenen Kultur wieder, die bei etwa  $6 \times 10^7$  Zellen/ml in der späten log-Phase geerntet wurde

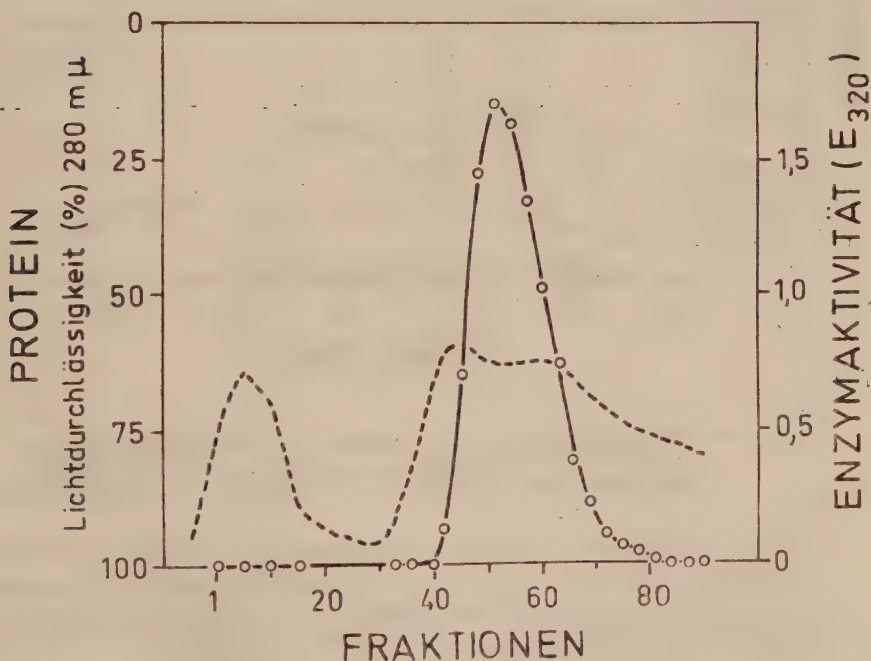


Abb. 16: Chromatographie der Fraktion mit Chorismat-Mutase Aktivität nach Calcium-Phosphat-Gel Ad- und Desorption auf Hydroxyl-Apatit  $p_H$  7,5. Näheres siehe Material und Methodik. (--) Protein (o) Enzymaktivität.

(näheres siehe Material und Methodik). Abb. 16 gibt das Eluationsprofil einer Hydroxyl-Apatit Säule  $p_h$  7,5 wieder, mit einem Phosphatgradienten von 0,0 bis 0,05 molar. Das Protein wurde bei 280 m $\mu$  gemessen und mit 10fach verstärkter Empfindlichkeit auf den Schreiber übertragen.

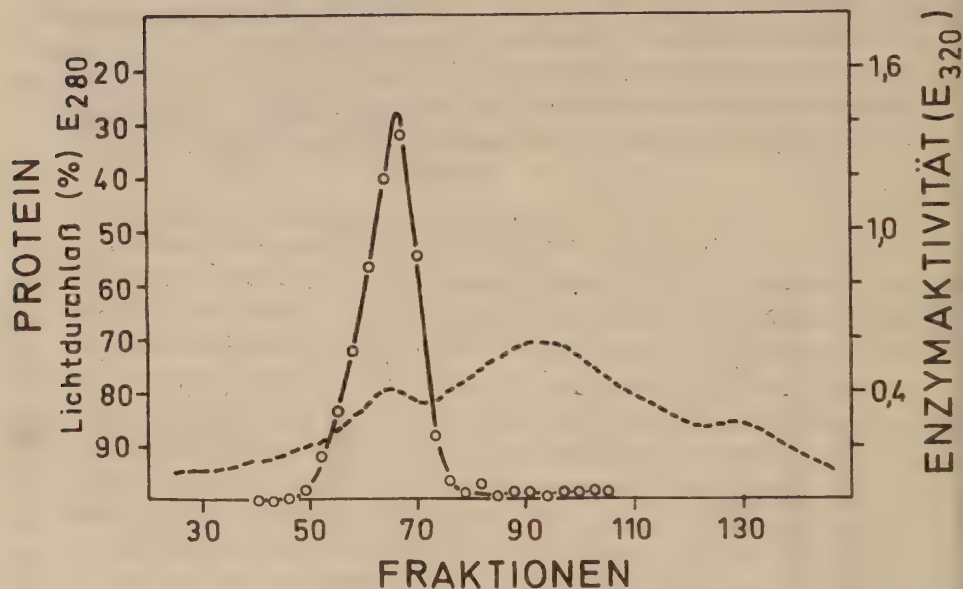


Abb. 17: Chromatographie der Fraktion mit Chorismat-Mutase Aktivität nach Hydroxyl-Apatit  $p_h$  7,8 - 7,0 auf Sephadex-Gel G 200. (--) Protein (o) Enzymaktivität.

Abb. 17 zeigt den letzten Reinigungsschritt, nämlich Chromatographie auf Sephadex-Gel G 200. Der Schreiber gab in diesem Fall eine 50fache Verstärkung der Absorption der Fraktionen bei 280 m $\mu$  wieder.

#### C. NACHWEIS AUF ISOZYME DURCH ELEKTROPHORESE

Die aktiven Fraktionen nach der Chromatographie auf G 200 Sephadex wurden über Hydroxyl-Apatit eingengt und je 25  $\mu$ g

auf 10 cm lange, 7,5 %ige Polyacrylamidgele aufgetragen. Je Röhrchen wurde eine Stromstärke von 1,5 mA angelegt, nach 6 Stunden, die Bromphenolblaubande hatte das anodische Ende des Gels erreicht, wurde die Elektrophorese abgebrochen. Ein Gel wurde gefärbt und die restlichen in Scheibchen von etwa 1 - 2 mm Dicke zerschnitten. Von diesen Scheibchen wurde wiederum 1/4 zur Kontrolle angefärbt, der Rest in einem Dialyseschlauch mit 0,5 ml Standardpuffer zerdrückt und gegen den gleichen Puffer 12 Stunden dialysiert. Zwei Scheibchenviertel färbten sich. Die gleichen Scheibchen zeigten auch enzymatische Aktivität, die sowohl mit Tyrosin und Phenylalanin gehemmt, als auch mit Tryptophan aktiviert werden konnte (In Abb. 18 der Übersicht wegen nicht angegeben).

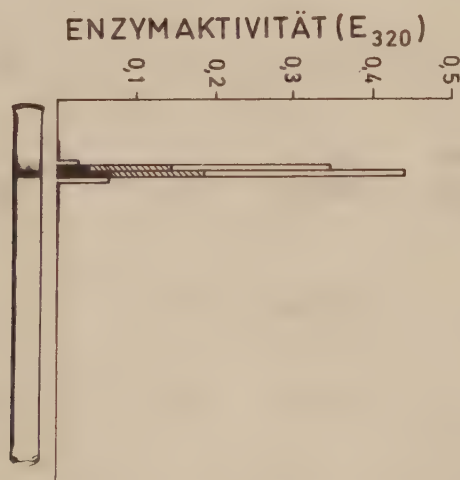


Abb. 18: Fraktionierung eines 7,5 % Polyacrylamidgels mit Bestimmung der enzymatischen Aktivität (unschraffiert), der Hemmbarkeit durch  $5 \times 10^{-4}$  m L-Tyrosin (schwarz), durch  $2 \times 10^{-5}$  m L-Phenylalanin (schräge Schraffur). 25  $\mu$ g gereinigtes Protein (2930fach) wurden auf das Gel aufgetragen und das Gel im angegebenen Bereich in ca. 1 - 2 mm dicke Scheiben zerschnitten.

Tab.6

Reinigung der Chorismat Mutase von *Euglena gracilis*

| Reinigungs-<br>schritt                                     | Protein | spez. Akti-<br>vität | Ausbeute | Reinigung |
|------------------------------------------------------------|---------|----------------------|----------|-----------|
| Rohextrakt<br>(dialysiert)                                 | 46 g    | 0,85                 | 100      | 1         |
| rib.freier<br>Extrakt                                      | 19 g    | 2,22                 | 108      | 2,6       |
| Protaminsul-<br>fatfällung                                 | 12,7 g  | 3,3                  | 106      | 3,9       |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub><br>flüssig | 3,33 g  | 11,4                 | 97       | 18,7      |
| Calcium-P Gel<br>frak. Ad- und<br>Desorption               | 639 mg  | 52,2                 | 85       | 61,4      |
| Hydroxyl-<br>apatit pH <sub>7,5</sub>                      | 98,5 mg | 172                  | 43,4     | 202       |
| Hydroxyl-<br>apatit pH <sub>7,1</sub>                      | 66,3 mg | 343                  | 58       | 403       |
| Hydroxyl-<br>apatit<br>pH <sub>7,8-7,0</sub>               | 30,5 mg | 489                  | 38,2     | 575       |
| G 200 Sepha-<br>dex                                        | 2,55 mg | 2490                 | 16,2     | 2930      |

Spezifische Aktivität: gebildete  $\mu$ Mole Prephenat/h/mg Protein

### 3. Allosterische Eigenschaften der Chorismat-Mutase von *Euglena gracilis*

#### A. WIRKUNG DER HEMMER

Bereits nach der Ammonsulfatfällung zeigte sich eine Verschiebung der Wirksamkeit der negativen Effektoren zugunsten von Tyrosin. Dieses Hemmuster, wie es in Abb. 19 dargestellt ist, erwies sich als stets gleichbleibend, unabhängig ob das Enzym 200-, 600- oder 2900fach angereichert war. Tyrosin hat an Hemmwirkung gegenüber dem Rohextrakt etwas gewonnen, Phenylalanin etwas verloren, doch beide wirken im gleichen Konzentrationsbereich wie im Rohextrakt.

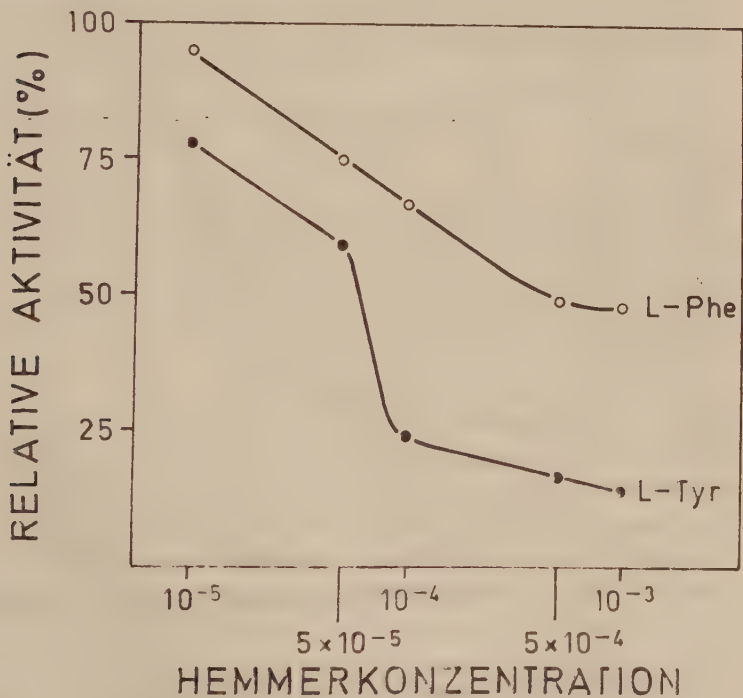


Abb. 19: Wirkung der negativen Effektoren auf die Chorismat-Mutase Aktivität einer 600fach angereicherten Präparation. Die Enzymaktivität ohne Effektor wurde als 100 % gesetzt. (Inkubation 1 µg Enzym 30 Min. bei 30°).

## B. WIRKUNG DES AKTIVATORS

Noch eine weitere Eigenschaft des Enzyms, nämlich die Wirkung von Tryptophan auf den Hemmeffekt von Tyrosin und Phenylalanin wurde an angereicherten Enzympräparationen untersucht. Während Prae- und Hauptinkubation lag gleiche Molarität an Puffer, Mercaptoäthanol und BSA vor. Nach der Vorinkubation wurden die entsprechenden Effektoren durch Volumensverdopplung auf die Hälfte verdünnt. Wie aus Abb. 20 zu entnehmen ist,

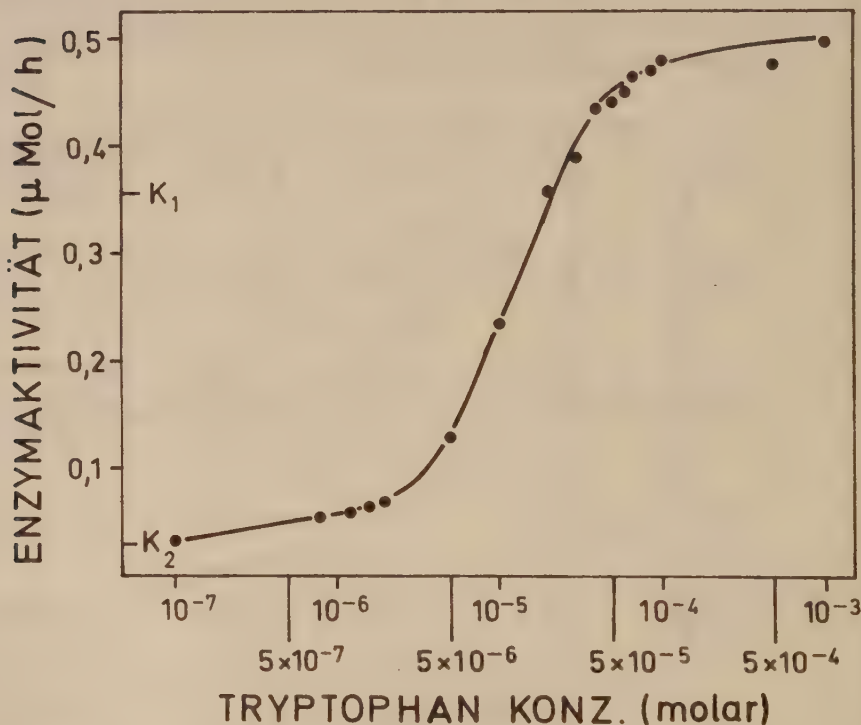


Abb. 20: Effekt des Aktivators Tryptophan auf die Hemmwirkung von Phenylalanin plus Tyrosin bei  $p_H$  8,4.  $K_1$  Vor- und Hauptinkubation ohne Effektor,  $K_2$  Vorinkubation mit negativen Effektoren, Hauptinkubation ohne Effektor. Endkonzentration jedes Hemmers  $5 \times 10^{-4}$  m, zusammen also  $10^{-3}$  m. Teste wurden mit  $1 \mu g$  600fach angereichertem Enzym und neg. Effektor 5 Min. vorinkubiert, in Eis gestellt, Substrat und Tryptophan zugegeben und weitere 30 Min. bei  $30^\circ$  inkubiert.

reicht  $1/50$  der Hemmerkonzentration für Tryptophan aus, um den negativen Effekt zu eliminieren ( $K_1$  = Vor- und Hauptinkubation ohne Effektor). Erst bei  $10^{-7}$  molarer Aktivatorkonzentration i.e.  $1/10\ 000$  der Konzentration der negativen Effektoren ist kein Einfluß des Tryptophans auf die Hemmbarkeit der Enzymaktivität mehr erkennbar ( $K_2$  = Vorinkubation mit negativen Effektoren, Hauptinkubation ohne Effektoren).

Vergleicht man diese Ergebnisse mit den Werten, die bei einem gleichen Versuch mit dem Rohextrakt erzielt wurden, so ergibt sich gute Übereinstimmung. Es war  $10^{-4}$  molare Tryptophankonzentration benötigt worden, um die Hemmwirkung der negativen Effektoren auszuschalten; das angereicherte Enzym benötigte nur  $1/4$  der Tryptophankonzentration, um den gleichen Effekt zu erzielen.

#### C. WIRKUNG VON pCMB UND 2-MERCAPTOÄTHANOL

Es lag nahe zu untersuchen, ob und inwieweit SH-Gruppen die allosterischen und katalytischen Eigenschaften der angereicherten Chorismat-Mutase beeinflussen. Gerhard und Pardee hatten 1961 an der Aspartat-Transcarbamylase von E.coli gezeigt, daß kurzzeitige Inkubation mit pCMB oder Erhitzen auf  $50^\circ$  die Hemmbarkeit der Enzymaktivität durch CTP beseitigt. Führte man 5- und 10minütige Vorinkubationen bei  $30^\circ\text{C}$  mit verschiedenen Konzentrationen pCMB durch und setzte dem Reaktionsgemisch BSA ( $50\ \mu\text{g/ml}$ ) zur Stabilisierung der Chorismat-Mutase zu, so zeigten sich keine signifikanten Änderungen der Enzymaktivität oder -eigenschaften. 2-Mercaptoäthanolvorinkubation bewirkte in Konzentrationen zwischen  $10^{-6}$  bis  $10^{-2}$  molar eine geringe Steigerung der Hemmwirkung des Tyrosins wie auch des Phenylalanins. Ebenso wurde die Aktivität und Aktivierbarkeit der Chorismat-Mutase durch 2-Mercaptoäthanol im Bereich zwischen  $10^{-5}$  bis  $10^{-2}$  molar geringfügig gesteigert. Keine dieser Reaktionen ist jedoch von der Anwesenheit von 2-Mercaptoäthanol oder anderen reduzierenden Agentien (Dithiothreitol, Glutathion etc.) abhängig.

#### D. WIRKUNG VON PREPHENAT

Weiterhin mußte nachgeprüft werden, ob möglicherweise das Produkt des enzymatischen Umsatzes, Prephensäure, die Aktivität der Chorismat Mutase hemmt; Cardaro und Balbinder (1968) hatten dies für die Anthranilat-Synthetase aus *Salmonella typhimurium* gezeigt, die außer durch Tryptophan auch noch durch Anthranilsäure gehemmt wird. Da jedoch im üblichen Routineenzymtest die gebildete Prephensäure bestimmt wird, läßt in diesen Versuchen der Verbrauch an Chorismat direkt spektrophotometrisch bei 272 m $\mu$  bestimmt werden. Bei diesen Versuchen wurde das Substrat in  $6 \times 10^{-4}$  molarer Konzentration eingesetzt, 20  $\mu$ g 600fach angereichertes Enzym zugegeben und die Reaktion in 0,1 molarer Tris-Cl Puffer  $p_H 7,5$ , 50  $\mu$ g/ml BSA und  $10^{-3}$  molarem Mercaptoäthanol ablaufen lassen. Gemessen wurde gegen die entsprechende Kontrolle ohne Enzym, um gleichzeitig den geringen Zerfall des Kaliumchorismats während der Inkubation bei 31°C zu berücksichtigen (weniger als 1 % in 15 Min.). In einer dritten Küvette war mit dem Enzym auch noch Kaliumprephenat in einer Konzentration von  $5 \times 10^{-4}$  molar einpipetiert worden. Es zeigte sich keine Hemmung auf den Substratverbrauch des Enzyms durch die Anwesenheit des Produkts der Reaktion.

#### E. WIRKUNG DER WASSERSTOFFIONENKONZENTRATION AUF DIE EIGENSCHAFTEN UND AKTIVITÄT DES ENZYMS

Die Untersuchung dieser Abhängigkeiten zeigt wohl eine der interessantesten Eigenschaften der Chorismat-Mutase von *E. coli*. Abl. 21 zeigt die absoluten Mengen umgesetzten Substrats in Abhängigkeit vom  $p_H$ -Wert im Testsystem mit und ohne Effektoren. Mit Ausnahme der Puffer für  $p_H 6,0$  und 6,5 (Kaliumphosphat) wurden 0,1 molare Tris-Cl Puffer verwendet. Es war jedoch in einem Vorversuch nachgewiesen worden, daß die dargestellten Abhängigkeiten tatsächlich von  $p_H$ -Wert und nicht von der Anwesenheit von Phosphationen abhängen. Die Wirkung der negativen Effektoren ist im schwach sauren Bereich sehr gering und nimmt zum alkalischen

Bereich hin rasch zu. Die Aktivität des Enzyms ohne Effektor durchläuft ein  $p_h$ -Optimum zwischen  $p_h$  7,0 und 7,5, um zum alkalischeren  $p_h$  schnell an Aktivität zu verlieren. Am Überraschendsten erwies sich die Beziehung zwischen Aktivierung (Aufhebung der Hemmbarkeit) und wechselnden  $p_h$ -Werten. Obwohl in den Testgemischen doppelt so viel Tyrosin und 10 mal soviel Phenylalanin wie Tryptophan vorhanden war, ist

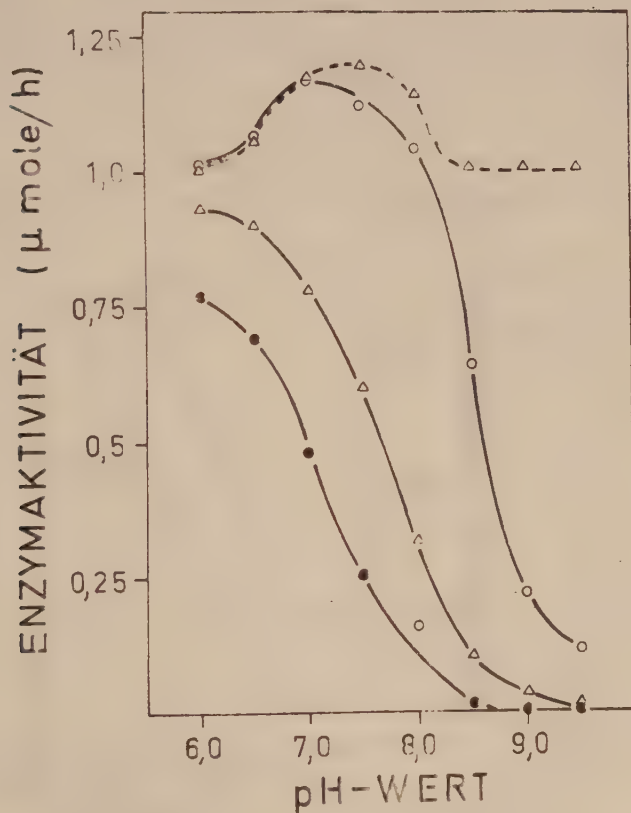


Abb. 24: Abhängigkeit der Aktivität, der Hemm- und Aktivierbarkeit von der Wasserstoffkonzentration. (●)  $5 \times 10^{-4} m$  L-Tyrosin, (▲)  $10^{-3} m$  L-Phenylalanin (○) ohne Effektor, (Δ)  $5 \times 10^{-4} m$  L-Tyr +  $10^{-3} m$  L-Phe +  $10^{-4} m$  L-Try wurden dem Testgemisch zugesetzt.  $0,5 \mu g$  29301 nach angereichertes Protein wurden 10 Min. bei  $30^\circ C$  mit den Testgemischen inkubiert.

der positive Effektor über den gesamten untersuchten  $p_h$  Bereich zwischen  $p_h$  6,0 bis  $p_h$  9,5 in der Lage, die Wirkung der negativen Effektoren aufzuheben, ja noch mehr, Tryptophan kompensiert den Einfluß von niedrigen Wasserstoffionenkonzentrationen wie der Abb. 21 zu entnehmen ist. Mit Aktivator plus Hemmer zeigt die Chorismat-Mutase ein  $p_h$ -Optimum bei 7,5, sinkt jedoch nicht unter einen bestimmten Wert ab, sondern erreicht bei  $p_h$  6,0 ebenso wie ab  $p_h$  8,5 ein konstantes Grundniveau, während das Enzym ohne Effektoren bei  $p_h$  9,5 nur noch etwa 10 % der Aktivität wie bei  $p_h$  6,0 erreicht. Ähnlicher

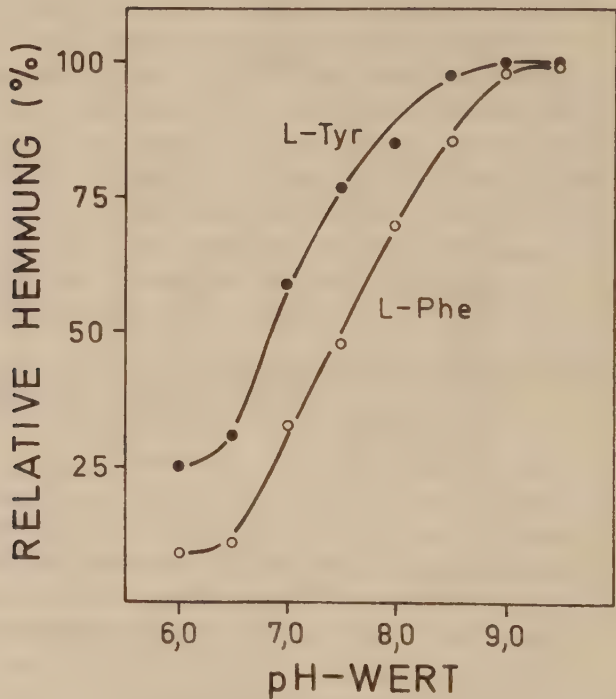


Abb. 22:  $p_h$  Abhängigkeit der relativen Hemmwirkung von Tyrosin und Phenylalanin. Wirkung von (●)  $5 \times 10^{-4} M$  L-Tyr (○)  $10^{-3} M$  L-Phe bezogen auf 100 % Wert = Aktivität ohne Effektor bei entsprechendem  $p_h$  (Daten wie Abb. 21).

Kurvenverlauf von "aktiviertem" und effektorfreiem Enzym zeigt sich zwischen  $p_h$  6,0 bis 8,0. Tiefere Aufschlüsse über diese Abhängigkeiten lassen sich durch Substratsättigungsverhalten bei verschiedenen  $p_h$  Werten mit und ohne Effektoren und Bestimmung der Zwischenwirkungen der Komponenten mit dem Substrat erzielen. Soviel jedoch läßt sich aus diesen Versuchen schon interpretieren: die Wasserstoffionenkonzentration hat vermutlich in erster Linie einen Einfluß auf die Konfiguration des Enzyms und die geänderte Konfiguration hat eine geänderte Wirkung der negativen Effektoren zur Folge. Tryptophan, in entsprechenden Konzentrationen, ist in der Lage, eine Konfiguration (-änderung) herbeizuführen, die vom  $p_h$  Wert weitgehend unabhängig ist; sie gestattet den Hemmern keine Wirkung auf die Enzymaktivität auszuüben, da möglicherweise Tyrosin und Phenylalanin nicht mehr

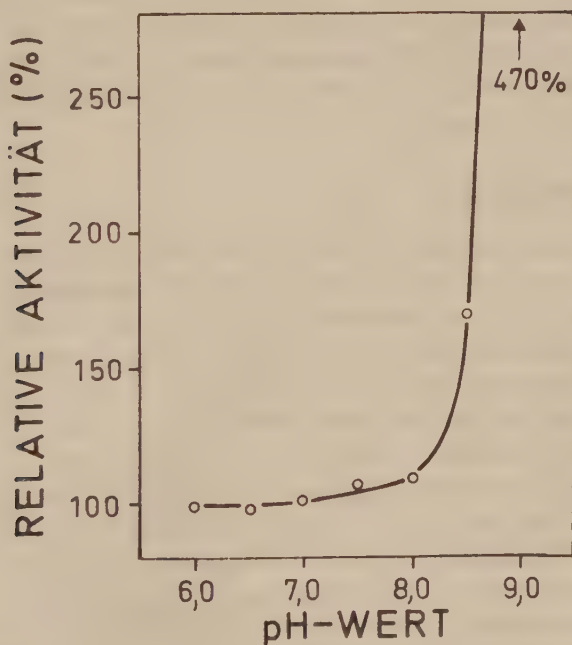


Abb. 23:  $p_h$ -Wirkung auf die Aktivierbarkeit von Chorismat-Mutase durch Tryptophan. Dem Testgemisch waren zugesetzt:  $5 \times 10^{-4}m$  L-Tyr,  $10^{-5}m$  L-Phe und  $10^{-4}m$  L-Tryptophan (Daten wie Abb. 21).

an die spezifischen allosterischen Bindungsorte angelagert werden können.

Noch deutlicher wird die Wirkung zwischen Wasserstoffionenkonzentration (Konfiguration) und Hemmbarkeit, wenn man die relative Hemmung, d.h. die Hemmung in % bezogen auf den un gehemmten Wert unter gleichen Bedingungen ( $p_h$ ), gegen den  $p_h$ -Wert aufträgt (Abb. 22). Die gleiche Tyrosinkonzentration ( $5 \times 10^{-4}$  m), die bei  $p_h$  6,0 zu 25 % die Enzymaktivität hemmt, führt bei  $p_h$  9,0 zur totalen Blockierung der Aktivität des Enzyms; ähnlich verläuft die Kurve, wenn Phenylalanin als Hemmer verwendet wird. Setzt man (Abb. 23) die Wirkung des Tryptophans in Relation zu der Aktivität - ohne zugesetzten Effektor - bei dem gleichen  $p_h$  Wert, so erhält man z. B. bei  $p_h$  9,0 eine Steigerung um 470 % und bei  $p_h$  7,5 eine von 910 %. Abb. 21 enthält die Erklärung für dieses Verhalten. Zum alkalischen  $p_h$  Bereich sinkt die Enzymaktivität ohne Effektoreinwirkung stark ab; das mit Tryptophan inkubierte Enzym erreicht zwischen  $p_h$  8,5 und 9,5 einen konstanten Pegel.

#### 4. Enzymkinetik

Um weiteren Aufschluß sowohl über den Wirkungsmechanismus der Effektoren wie auch der Wasserstoffionenkonzentration auf die Enzymaktivität zu erhalten, wurden unter verschiedenen Bedingungen Untersuchungen mit Enzymkinetiken durchgeführt. Diese Arbeiten wurden dadurch erschwert, daß im Gegensatz z.B. zur Aspartat-Transcarbamylase (Gerhart u. Pardee 1961, 1962) und Threonin-Deaminase (Changeux 1963) von E.coli weder Hitze- noch Mercuriatbehandlung die Eigenschaften der Chorismat-Mutase änderten. Es war daher nicht möglich, Zwischenwirkungen von Effektoren auf das Enzym ohne gleichzeitige Anwesenheit von Substrat zu messen. Die Zahl der Bindungsstellen durch Anlagerung der Chorisminsäure an das Enzym kann weder mit radioaktivem Substrat, da es sofort zur Prephensäure umgesetzt wird, ermittelt, noch optisch bestimmt werden, aus eben dem gleichen Grund. Selbst bei Bindung eines Chorismatanalogs kann die erforderliche Proteinkonzentration nicht erreicht werden.

### A. SUBSTRATBEZIEHUNG BEI $p_h$ 8,4

Betrachtet man die Wirkung von steigenden Substratmengen auf die Enzymaktivität bei  $p_h$  8,4, so zeigt sich ein sigmoider Kurvenverlauf (Abb. 24), der aussagt, daß das Enzym in irgend einer Weise in einer Zwischenwirkung zu mehr als einem Substratmolekül steht. Wie früher bereits gezeigt und später noch einmal dargelegt wird, handelt es sich bei der Chorismat-Mutase um ein Enzym, das dem K-System der allosterischen Proteine angehört. Benützt man die Terminologie des MWC Modells (Monod, Wyman, Changeux 1965) und setzt das Substrat als allosterischen

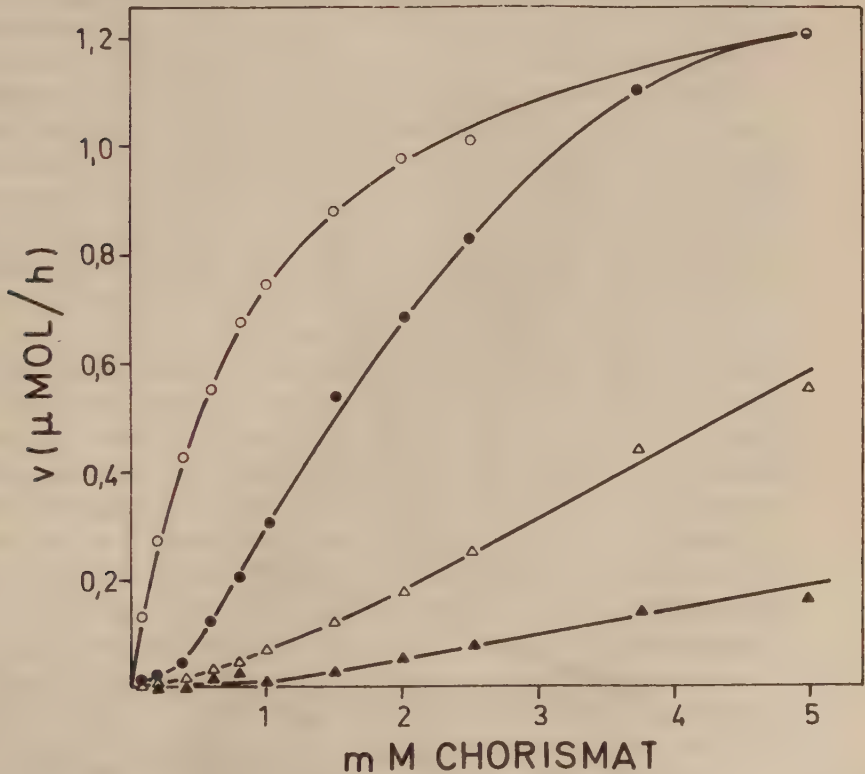


Abb. 24: Substratsättigungskurve des 2930fach angereicherten Enzyms; bei  $p_h$  8,4. (●) ohne Effektor, (o) mit  $5 \times 10^{-5} m$  L-Tryptophan, (Δ) mit  $5 \times 10^{-5} m$  L-Tyrosin, (▲) mit  $5 \times 10^{-4} m$  L-Tyrosin. Inkubation 10 Min. bei  $30^\circ$  mit  $0,5 \mu g$  Enzym.

Liganden, so spricht der Verlauf der Substratsättigungskurve für einen homotropen, cooperativen Effekt. Noch ein weiterer Schluß läßt sich aus dem erwähnten Kurvenverlauf und der doppelt reziproken Darstellung (Abb. 25) ziehen: ohne Substrat (bzw. mit sehr geringer Substratkonzentration d. h. ohne Zwischenwirkung) hat das Enzym bei  $p_H$  8,4 eine Konfiguration, die nur geringe Affinität zum Substrat zeigt. Die Kurven mit  $5 \times 10^{-5}$  m und  $5 \times 10^{-4}$  m L-Tyrosin weisen keinen offensichtlichen sigmoidalen Verlauf auf, stellen aber möglicherweise den flachen Anfangsast einer solchen Kurve dar. Setzt man dem Enzym jedoch den Aktivator in  $5 \times 10^{-5}$  m Konzentration zu, so erhält man eine völlig hyperbolische Sättigungskurve. Abb. 25 gibt die doppelt

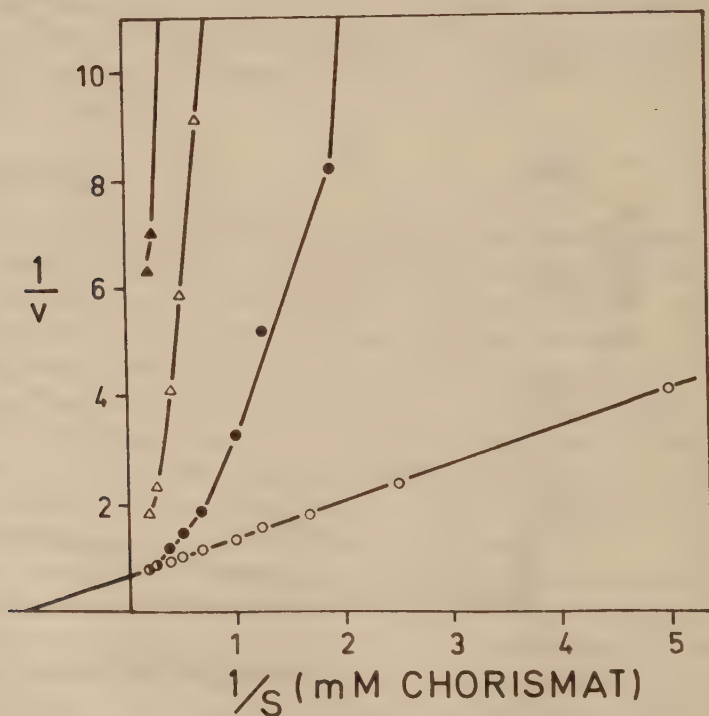


Abb. 25: Doppelt reziproke Darstellung von Abb. 24, Legende wie Abb. 24.

reziproke Darstellung von Abb. 24 wieder und bestätigt einerseits, daß die Chorismat-Mutase als K-Typ eines allosterischen Enzyms vorliegt und andererseits, daß Zugabe von Tryptophan eine normale Michaelis Kinetik zur Folge hat. Dadurch ist es möglich, für die Chorismat Mutase bei  $p_h$  8,4  $V_{\max}$  zu bestimmen. Das ist die Voraussetzung um die Zwischenwirkung der Liganden, auch bei Gegenwart eines Effektors, festzustellen und nicht indirekt aus der Gestalt der Substratsättigungskurve abzuleiten. Dazu bedient man sich der Hill Gleichung, die Changeux (1963) folgendermaßen formulierte:

$$\log \frac{v}{V_{\max} - v} = n \log S - \log K$$
 wobei  $v$  dem enzymatischen Umsatz,  $V_{\max}$  der maximalen Geschwindigkeit bei Substratsättigung,  $S$  der Substratkonzentration,  $K$  einer Konstanten und  $n$  dem Zwischenwirkungskoeffizienten (Monod et al. 1963) oder nach Atkinson et al. (1965) einer Funktion der Anzahl der zwischenwirkenden Substratbindungsstellen pro Enzymmolekül und der Kraft der Zwischenwirkung entspricht. Ist diese stark, so ist auf der graphischen Darstellung ("Hill-Plot") die Neigung  $n$  der resultierenden Geraden numerisch gleich mit der Anzahl der Bindungs-orte. In Abb. 26 beweist ein  $n$  von 2.0 für das Enzym mit dem Substrat als alleinigen Liganden, daß eine sehr ausgeprägte, homotrope, cooperative Wechselbeziehung in einem Bereich von 3 % - 90 %  $V_{\max}$  besteht. Das Abbiegen der Geraden im Bereich der geringsten Substratkonzentration ist zu erwarten und besagt, daß bei dieser Konzentration nur noch ein Ligand gebunden werden kann und daher keine Zwischenwirkung mehr möglich ist. Kinetische Daten lassen keinen absoluten Schluß auf die Anzahl der Bindungsorte zu, jedoch zeigt in diesem Fall die strenge Linearität des logarithmischen Ausdrucks ( $\frac{v}{V_{\max} - v}$ ) gegen den der Substratkonzentration und die Tatsache, daß bei den gewählten Bedingungen ( $p_h$  8,4), eine Reaktion zweiter Ordnung vorliegt (nach Atkinson (1965) gibt  $n$  auch die Ordnungszahl der chem. Reaktion an) und somit drei Reaktionskomponenten beteiligt sind, nämlich Enzym, Substrat und Substratzwischenwirkung, daß mindestens zwei Substratmoleküle an ein Enzymmolekül gebunden werden. Diese Annahme erscheint um so berechtigter, als die Untersuchungen mit 2930fach angereichertem

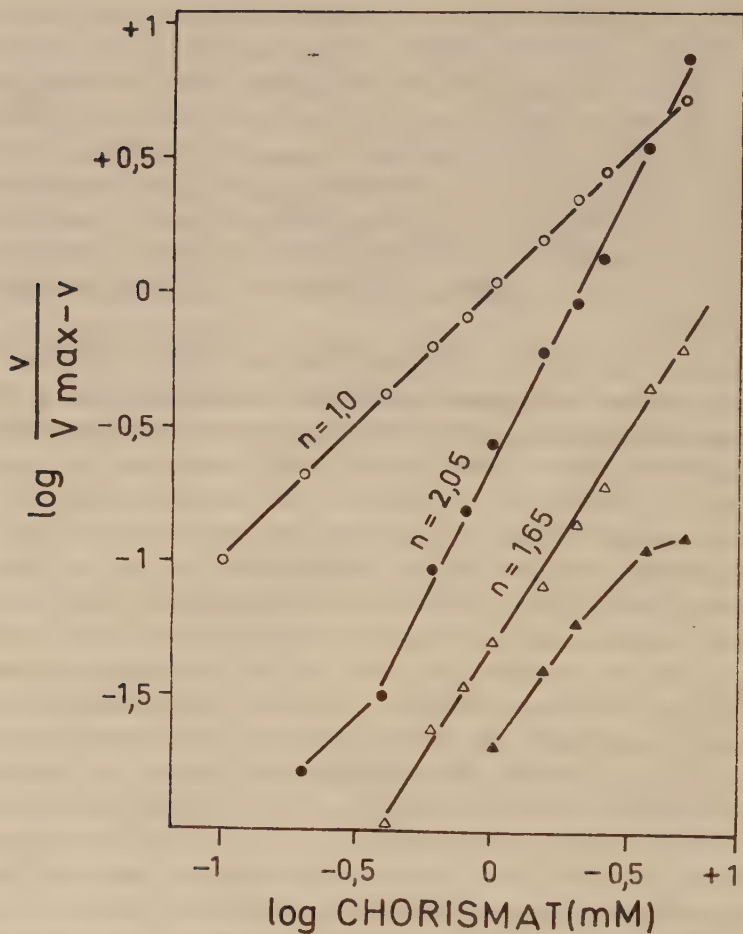


Abb. 26: Hill-Plot für die Wirkung der Substratkonzentration auf die Enzymaktivität von 2930fach angereichertem Enzym bei  $p_H$  8,4.  $V_{\max}$  wurde aus Abb. 25 ermittelt, die anderen Daten und die Legende entsprechen Abb. 24.

Enzym durchgeführt wurden und eine unspezifische Zwischenwirkung von Proteinen damit unwahrscheinlich ist. Findet keine gegenseitige Zwischenwirkung statt, so ist aus theoretischen Überlegungen

ein  $n$  von 1,0 zu erwarten. Wie aus Abb. 26 hervorgeht, bewirkt Zugabe von Tryptophan ein  $n$  von 1,0, also eine völlige Aufhebung der Zwischenwirkung des Substrats. Dieser Effektor ändert die Ordnung der Reaktion in Hinblick auf das Substrat, das Enzym reagiert bei Gegenwart von Tryptophan nach einer Michaelis-Menten Kinetik über den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich (Beweise: hyperbolische Substratsättigungskurve Abb. 24, Gerade in Lineweaver-Burk Darstellung Abb. 25,  $n = 1$  im Hill-Plot Abb. 26). Schwieriger gestaltet sich die Interpretation der Ergebnisse, die in Anwesenheit eines Hemmers erzielt wurden. Es wäre zu erwarten, daß Zugabe des Hemmers eine Steigerung von  $n$ , eine Reaktion höherer Ordnung bewirken würde, wenn, was bei allosterischen Enzymen vom K-Typ üblich ist, ein kompetitiver Effekt des Substrats gegen den Hemmer ausgeübt wird (Sind jedoch nur 2 Substratbindungsorte vorhanden, so ist ein  $n$  größer als 2 nicht möglich). Dieses Verhalten würde sich in einem deutlich sigmoidalen Substratsättigungskurvenverlauf zeigen. Der  $p_h$ -Wert von 8,4 scheint jedoch eine Enzymkonfiguration so stark zu begünstigen, daß mit den Substratkonzentrationen, die in den Testansätzen möglich sind, kein sigmoidaler Verlauf der Substratsättigungskurve bei den gegebenen Hemmerkonzentrationen beobachtet werden kann. Es fehlt ein ausgeprägter kompetitiver Substrateffekt. Die erhaltenen Daten ( $n = 1,65$ , verminderte Zwischenwirkung des Substrats gegenüber  $n = 2,0$  für Zwischenwirkung ohne Effektor) deuten darauf hin, daß die ermittelten Werte alle im flachen Anfangsast der Substratsättigungskurve liegen. Untersuchungen der gleichen Art bei  $p_h$  7,0 gaben einen Hinweis für die Stichhaltigkeit dieser Interpretation.

#### B. SUBSTRATBEZIEHUNG BEI $p_h$ 7,0

Doch zuerst die entsprechenden Bezugsdaten. Wie aus den Untersuchungen bereits bekannt, zeigt die Chorismat-Mutase bei  $p_h$  7,0 eine maximale Aktivität und eine sehr geringe Hemmbarkeit. Aus Abb. 27 geht hervor, daß die Substratsättigungskurve bei  $p_h$  7,0 annähernd hyperbolisch verläuft. Nur in der doppelt

reziproken Darstellung in Abb. 29 ist die leichte Abweichung von der Michaelis-Kinetik im niederen Substratbereich deutlich erkennbar. Der Wert aus dem "Hill-Plot" mit 1,0 für 25 % - 80 %  $V_{\max}$  ist daher nicht erstaunlich, jedoch zeigen der nicht ganz hyperbolische Verlauf der Substratsättigungskurve, die Abweichung von einer Geraden im Lineweaver-Burk Plot (Abb. 29) und ein  $n$  von 1,14 im "Hill-Plot", daß bei

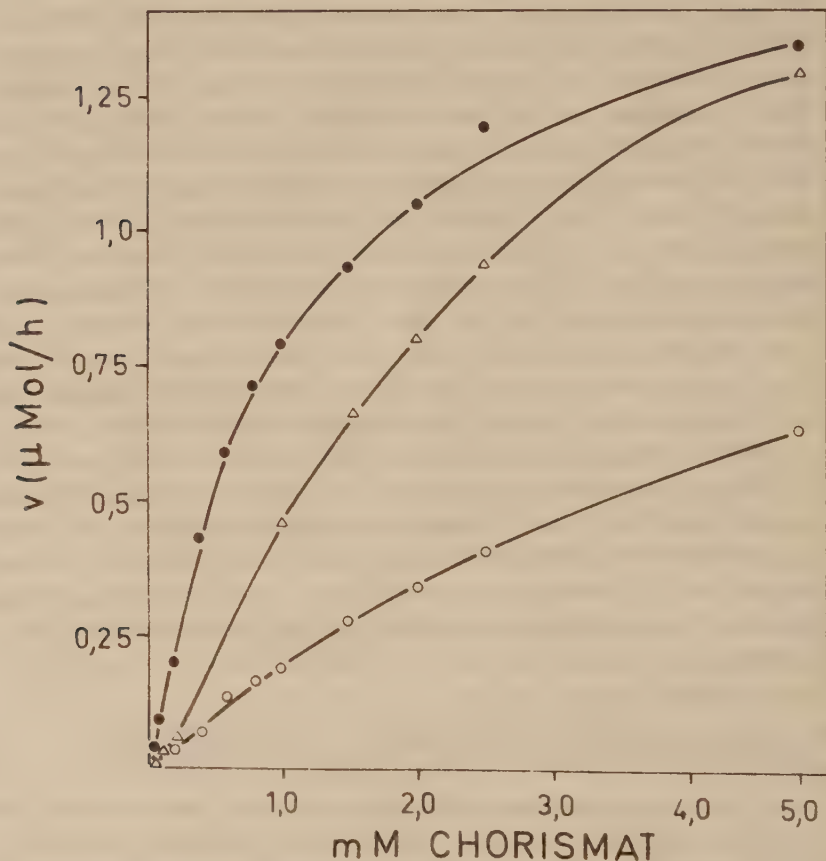


Abb. 27: Wirkung der Substratkonzentration auf die Enzymaktivität bei  $p_h$  7,0.  $0,5 \mu\text{g}$  wurden 10 Min bei  $30^\circ$  (●) ohne Zusatz, (Δ) mit  $10^{-4}\text{m}$  L-Tyrosin, (○) mit  $10^{-3}\text{m}$  L-Tyrosin inkubiert.

geringer Substratkonzentration eine, wenn auch nur schwache, Zwischenwirkung des Substrats festzustellen ist. Bei Anwesenheit von Tryptophan findet keine Zwischenwirkung der Substratbindung statt (nicht dargestellt). Aus Abb. 27 geht deutlich hervor, daß bei  $p_h$  7,0 steigende Mengen Substrat in der Lage sind, den Hemmeffekt von  $10^{-4} M$  L-Tyrosin abzuschwächen, es liegt eine gesteigerte Zwischenwirkung des Substrats vor, die sich in der Steigerung der Resultanten auswirken muß, wenn man den  $\log \left( \frac{v}{v_{\max} - v} \right)$  gegen den des Substrats

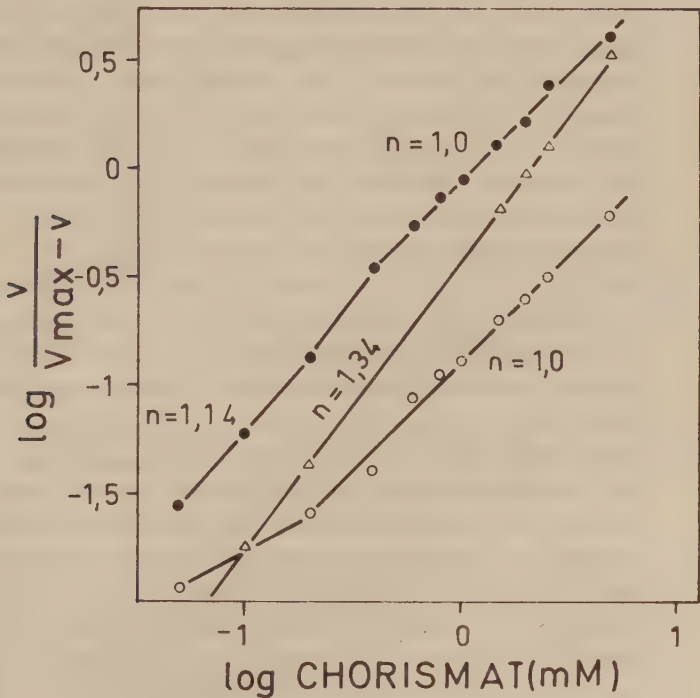


Abb. 28: Hill-Plots für die Substratsättigung.  $V_{\max}$  aus Abb.29, Daten aus und Legende wie in Abb. 27.

aufträgt. Aus Abb. 28 ist zu entnehmen, daß der Zwischenwirkungskoeffizient auf 1,34 steigt, also mit geeigneter Hemmerkonzentra-

tion Substratbindungsorte sich gegenseitig beeinflussen. Wird die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Substratkonzentration bei  $p_h$  7,0 in Anwesenheit von  $10^{-3} \text{ m}$  L-Tyrosin bestimmt, so ergibt sich ein  $n$  von 1,0 (Abb. 28), also keinelei Zwischenwirkung der Substratbindungsorte. Ähnlich wie bei den Untersuchungen bei  $p_h$  8,4 sind die beim Versuch einsetzbaren Chorismatkonzentrationen zu gering, um in diesem Fall eine Zwischenwirkung zu erzielen. Auf den Knick der Geraden im eben diskutierten Fall sei noch hingewiesen. Er deutet darauf hin, daß bei niederer Substratkonzentration bei  $p_h$  7,0 in Anwesenheit hoher Hemmerkonzentrationen die Bindung von Substrat an das Enzym erschwert wird und in diesem Bereich keine Reaktion erster Ordnung mehr vorliegt. Wichtige Aufschlüsse über die Art des allosterischen Enzyms liefert die doppelt reziproke Darstellung der Substratsättigungskurven bei  $p_h$  7,0 (Abb. 29). Die Kurven mit und ohne Hemmer schneiden in einem Punkt die  $1/v$  Achse, die Geschwindigkeit des enzymatischen Umsatzes ist somit gleich; die  $1/S$  Achse jedoch ergibt für Enzym ohne Effektor bei  $p_h$  7,0 einen  $K_m$  von  $10^{-3}$ , mit  $10^{-4} \text{ m}$  L-Tyrosin einen von  $3,3 \times 10^{-3}$  und mit  $10^{-3} \text{ m}$  L-Tyrosin einen von  $10 \times 10^{-3}$ . Um halb maximale Geschwindigkeit zu erreichen ist z.B. bei  $10^{-3} \text{ m}$  L-Tyrosin die 10fache Chorismatkonzentration notwendig als bei Abwesenheit des Effektors. Aus den Tatsachen, die in Abb. 29 wiedergegeben sind, läßt sich eindeutig ableiten, daß es sich bei der Chorismat-Mutase von *Euglena* um einen K-Typ eines allosterischen Enzyms handelt. Die Kurve für die höchste Tyrosinkonzentration zeigt einen fast zur Geraden gestreckten Verlauf, jedoch ist eine aufbiegende Tendenz feststellbar. Aus der prinzipiellen Ähnlichkeit der Kurvenverläufe für beide Tyrosinkonzentrationen läßt sich ein weiterer Hinweis ableiten, daß der Mechanismus der Hemmwirkung bei den verschiedenen Konzentrationen gleich ist. Auf die Darlegung der Wirkung von Phenylalanin auf die Zwischenwirkung der Substratbindungsorte wird verzichtet, da sich die Effekte und der Wirkungsmechanismus nicht von den für Tyrosin geschilderten Befunden unterscheiden.

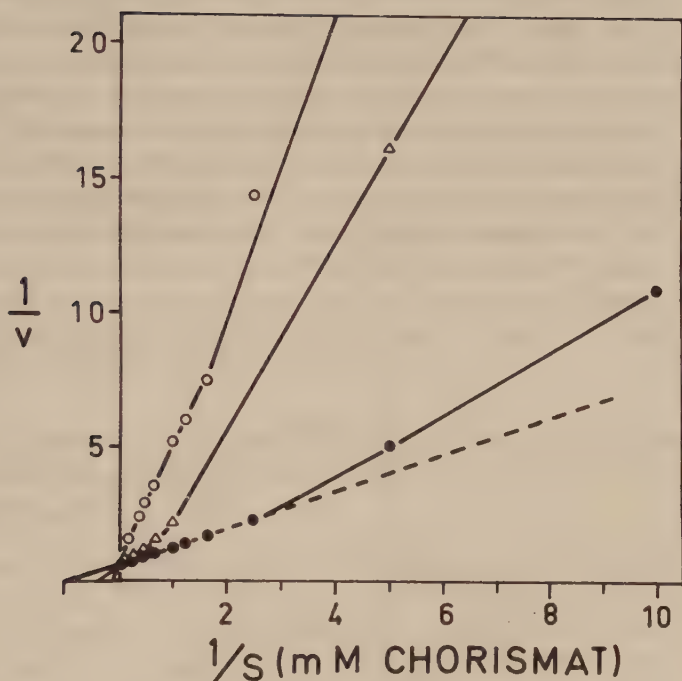


Abb. 29: Doppelt reziproke Darstellung der in Abb. 27 gegebenen Daten

### C. ZWISCHENWIRKUNG DER HEMMERBINDUNGSORTE

Auch Zwischenwirkungen der Hemmerbindungsorte lassen sich mit Hilfe der Hill Gleichung ermitteln, nach der Formel  $\log \left( \frac{v}{V_0 - v} \right) = \log K' - n' \log I$ , wobei  $v$  die Geschwindigkeit in Anwesenheit des Hemmers,  $V_0$  die ohne Hemmer,  $K'$  eine Konstante und  $I$  die Hemmerkonzentration wiedergeben.  $n'$  stellt auch hier ein Maß für die Cooperativität der Bindung des Hemmers (Monod et al. 1965) oder der Ordnung der Reaktion (Atkinson 1965) dar; es muß jedoch eingeschränkt werden, daß dabei von der Voraussetzung ausgegangen wird, daß die

verwendete Substratkonzentration bei allen Hemmerkonzentrationen, die im Test eingesetzt werden, den gleichen Einfluß ausübt. Diese Untersuchungen wurden mit einer Chorismatkonzentration die dem 2,5fachen  $K_m$  des ungehemmten Enzyms entspricht, durchgeführt und es erscheint fraglich, ob die Zwischenwirkung des Substrats bei allen Hemmerkonzentrationen, die getestet wurde eine unveränderliche Größe darstellt. In Abb. 30 ist der  $\log \left( \frac{v}{V_0 - v} \right)$  gegen den der Tyrosinkonzentration aufgetragen.  $p_h$  8,4 wird zwischen 80 % - 94 % von  $V_0$  ein  $n'$  von 1,2 erreicht: Bei  $p_h$  7,5 ergibt sich zwischen 33 % - 77 % von  $V_0$

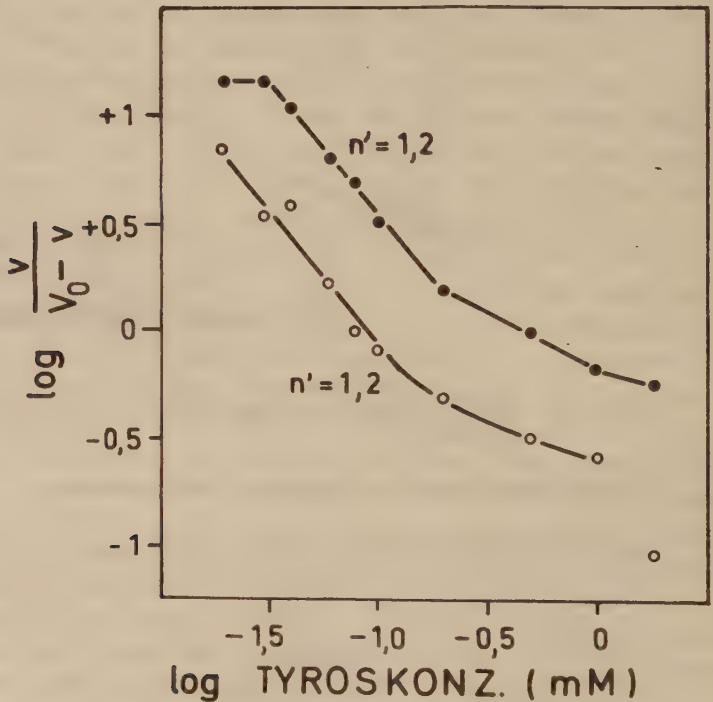


Abb. 30: "Hill-Plots" für die Wirkung von Tyrosinkonzentrationen auf die Aktivität der Chorismat Mutase. 0,5 ug wu den 10 Min. bei 30° mit den angegebenen Tyrosinkonzentrationen inkubiert. 2930fach angereicherte Enzympräparation wurde verwendet: (●) bei  $p_h$  8,4, (○) bei  $p_h$  7,5.

ebenso ein  $n'$  von 1,2. Aus den obigen Einschränkungen erscheint es vertretbar, dieses  $n'$  mehr als Hinweis dafür zu interpretieren, daß keine oder nur geringe Zwischenwirkung zwischen den Bindungsarten des Hemmers bei den in dem Versuch gegebenen Voraussetzungen besteht. Eindeutige Klärung, ob eine Zwischenwirkung vorliegt, wäre nur bei direkter Messung, also unter Ausschluß von Substrat möglich, jedoch wurde bereits am Anfang des Kapitels darauf hingewiesen, daß die Behandlungsmethoden, die bei anderen Enzymen zu diesem Zweck angewandt wurden, bei der Chorismat-Mutase keine, oder keine spezifische Wirkung zeigen. Mit dem zweiten Hemmer Phenylalanin wurden ähnliche Ergebnisse erzielt, jedoch überschritt  $n'$  bei  $p_h$  7,5 den Wert 1,0 nicht.

#### 5. Bestimmung der Größe der Chorismat Mutase mit Dichtegradientenzentrifugation und Sephadex Gel G 200 Chromatographie

$p_h$ -Abhängigkeit und Wirkung der Effektoren beruhen möglicherweise auf einer Konformationsänderung des Enzyms. Rosenbloom (1968) konnte bei der Phosphoglyzerat-Dehydrogenase von E.coli zeigen, daß bei neutralem  $p_h$  das untersuchte Enzym einen  $S_w$  von 7,7, im alkalischen Bereich jedoch einen  $S_w$  von 3,0 aufwies. M. Kapoor wies 1969 bei der Glutamin-Synthetase von Neurospora crassa nach, daß in Anwesenheit des Hemmers Anthranilsäure die Synthetase, die ungehemmt als Dimer mit einem Molekulargewicht von 340 000 vorliegt, in vermutliche Monomere mit einem Molekulargewicht von 180 000, die enzymatisch noch aktiv sind, spaltet. Anderson und Marvin zeigten 1969 an der Carbamylphosphat-Synthetase von E.coli, daß in Anwesenheit der positiven allosterischen Effektoren die Größe des Enzyms zunimmt und bei Anwesenheit eines negativen allosterischen Effektors abnimmt. Die große Verschiebung der Molekülgröße diskutieren die Autoren in Anlehnung an andere Arbeiten als eine von den allosterischen Effektoren abhängige Gleichgewichtseinstellung zwischen einer oligomeren und einer protomeren Form des Enzyms. Ohne Effektoren soll sich das Gleichgewicht schnell zwischen den beiden Formen einstellen.

Entsprechend diesen Befunden wurden bei der Chorismat-Mutase Gradientenzentrifugation und Molekulargewichtsbestimmung mit Sephadex Gel G 200 durchgeführt, um eventuelle Änderungen in der Molekülgröße festzustellen.

Eine solche Bestimmung ergab bei einer kalibrierten G 200 Sephadex Gel Säule (siehe Material und Methodik Abb. 3) bei  $p_H$  7,5 eine Größe von 158 - 160 000. Ein etwa 1400fach angereichertes Enzympräparat wurde verwendet. Bei dem gleichen  $p_H$  Wert ergab die Molekulargewichtsbestimmung mit Saccharosedichtegradientenzentrifugation (5 - 20 %) einen Wert von 161 000 bezogen auf Rinderserum Albumin (Abb. 24). Die Bestimmung wurde nach Martin und Ames (1961) sowohl mit 1100- wie mit 2930fach angereichertem Enzym durchgeführt. Um eine Verschiebung der Sedimentationsgeschwindigkeit des Enzyms, hervorgerufen durch Effektoren oder Wasserstoffionenkonzentration, leichter feststellen zu können, wurden bei den folgenden Versuchen als zusätzliche Marker Fumarase aus Schweineherz (MG 196 000) und Laktat Dehydrogenase aus Kaninchenmuskel (MG. 140 000) verwendet. Die Zentrifugationsdauer wurde auf 13 Stunden reduziert. Die drei Gradienten eines Laufs enthielten a) keinen Zusatz von Effektor, b) Tyrosin und Phenylalanin in je  $10^{-3}$  molarer Konzentration und c) Tryptophan in  $10^{-3}$  molarer Konzentration. Das Enzym mit den entsprechenden Markerproteinen wurde gegen entsprechenden Puffer mit dem unter a), b) und c) angegebenen Zusatz 12 Stunden lang dialysiert. Die erste Versuchsserie wurde bei  $p_H$  7,5 (alle Lösungen  $10^{-2}$  molar) durchgeführt. Es zeigten sich keine Veränderungen der Sedimentationseigenschaften des Enzyms in b) und c) gegenüber a); die Relation der Sedimentationsgeschwindigkeit zu den Eichproteinen blieb stets gleich. Auch die zweite Versuchsserie, bei  $p_H$  8,4 durchgeführt, zeigte das gleiche Ergebnis. Für die Chorismat-Mutase wurden bei  $p_H$  7,5 und  $p_H$  8,4 gleiche Sedimentationswerte bestimmt. Gradientenzentrifugation bei sauereren  $p_H$  Werten als 7,5 wurden wegen der schnellen Inaktivierung des Enzyms bereits am Neutralpunkt nicht verwendet.

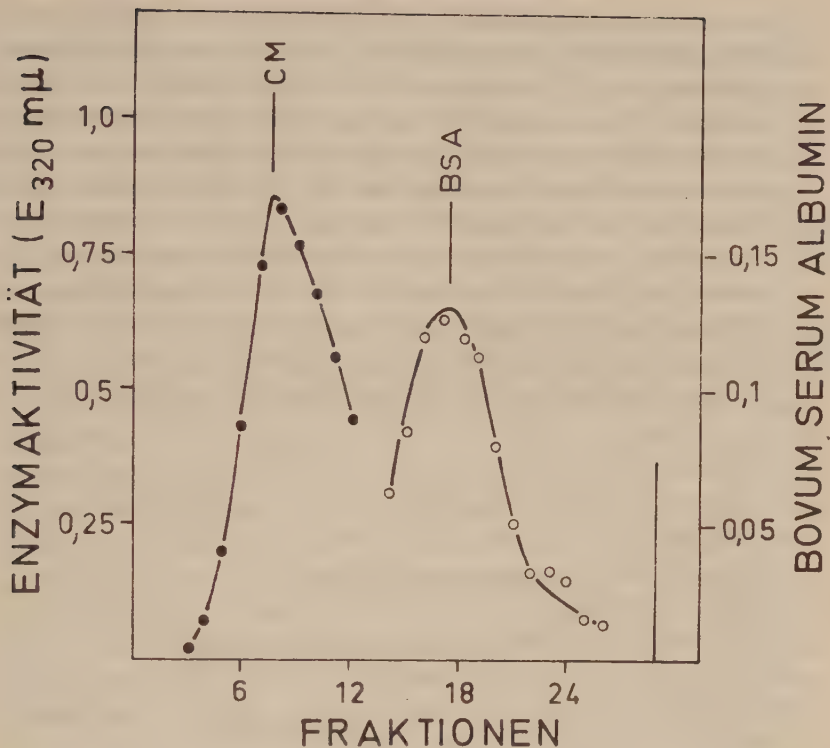


Abb. 31: Saccharose-Dichte-Gradienten Zentrifugation bei  $p_H$  7,5 mit  $5 \times 10^{-3}M$  Mercaptoäthanol. Dauer: 15 Stunden und 40 Min bei 40 000 UpM. 0,15 ml (10  $\mu g$ ) 1100 angereichertes Enzym + 0,05 ml (500  $\mu g$ ) BSA. 3 Tropfen Fraktionen gesammelt, auf 0,25 ml mit Sp aufgefüllt, 0,1 ml zu Enzymtest verwendet. Zur BSA Bestimmung gesamtes Fraktionsvolumen benützt.

## 6. Versuche zur Untereinheitenstruktur

Nachdem sichergestellt war, daß die Bande im Polyacrylamid-gel das angereicherte Enzym darstellt und nachgewiesen wurde, daß kein Multienzymkomplex vorliegt, wurden auch einige Versuche unternommen, um zu klären, aus welchen kleinsten Proteineinheiten das Enzym aufgebaut ist. Zu diesem Zweck wurde das Enzym

entsprechend der Methode von Shapiro et al. (1967) mit dem Detergens Natriumdodecylsulfat mit 1 % 2-Mercaptoäthanol drei Stunden bei 37° inkubiert und anschließend mit 2 % Jodacetamid weitere 90 Min. bei 37° behandelt, um eine Reaggregation der Enzymuntereinheiten durch reduzierte SH-Gruppen zu verhindern. Nach dieser Prozedur wurde das so behandelte Enzym gegen SH-freien Dodecylsulfatpuffer dialysiert und entsprechende Mengen (bis 250 µg) auf ein 5 %iges Polyacrylamidgel mit 0,1 % Natriumdodecylsulfat aufgetragen. Die Eichproteine wurden bei allen Behandlungsschritten in Anwesenheit von SH-Gruppen behandelt, um nicht nur die entsprechenden Monomere, sondern auch dimere Formen zu erhalten. Bei dem so behandelten Enzym trat eine

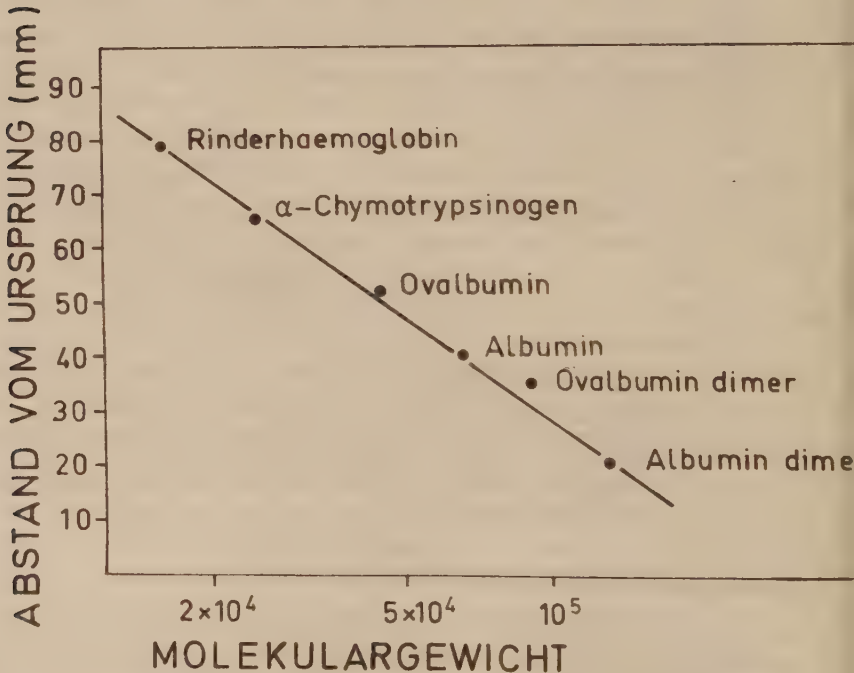


Abb. 32: Eichkurve für die Molekulargewichtsbestimmung mit Hilfe der Dodecyl-Sulfat-Gel-Elektrophorese. Aufgetragen wurden je 50 µg Rinderhaemoglobin und Rinderalbumin, je 100 µg α-Chymotrypsinogen u. Ovalbumin. Die Wanderung von Rinderhaemoglobin wurde als interne Standard verwendet.

sehr starke Proteinbande, die einem Molekulargewicht von 20 000 entspricht, auf, weiterhin ein etwas diffuser Fleck, der wahrscheinlich ein nicht völlig in Untereinheiten zerlegtes Protein oder einen Dissoziations-Assoziations Gleichgewichtszustand repräsentiert, eine sehr dünne Bande bei Molekulargewicht 38 000 und einige Schatten, die möglicherweise Verunreinigungen des Enzyms, die bei solch hohen Proteinmengen (250 µg) zum Vorschein kommen, oder aber noch nicht zerlegte höhere Polymere darstellen.

Mit einer zweiten Methode, nämlich der Oxydation mit Perameisensäure (nach Burgess 1969) und anschließend 16-stündiger Dialyse gegen 0,1 % Natriumdodecylsulfat wurde das Enzym in Untereinheiten zerlegt und die Molekulargewichte nach der gleichen Methode wie oben bestimmt. Wiederum wanderte eine Bande entsprechend einem Molekulargewicht von 20 000, eine weitere entsprechend etwa 43 000, eine dritte entsprechend von 53 000 und schließlich eine vierte entsprechend von 79 000. Diffuse Zonen traten im Gegensatz zur ersten Methode nicht auf, jedoch erhielt man eine andere Mengenverteilung. Nach der Spaltung mit dem Detergens liegt die überwiegende Menge des Proteins als Untereinheit vom Molekulargewicht 20 000 vor, während bei Perameisensäureoxydation und anschließender Dialyse gegen das Detergens die mengenmäßige Verteilung in folgender Reihenfolge erfolgt: 43 000, 20 000, 53 000 und 79 000. Das läßt einerseits den Schluß zu, daß die Prozedur das Enzym nicht vollständig aufspaltete und die Proteine mit dem MG von 43 000 und 79 000 möglicherweise Polymere der 20 000 Untereinheit darstellen. Es ist wegen der nicht absolut sauberen Enzympräparation nicht ganz auszuschließen, daß die Bande, die bei Molekulargewicht 53 000 erscheint, eine Verunreinigung darstellt. Auch die Vorbehandlung des Enzyms mit 8 m Harnstoff und Elektrophorese in 7,5 % Polyacrylamidgel in 6 m Harnstoff (es erfolgt Trennung nach Ladung der aufgefalteten Proteinketten) brachte keine Klärung. Neben einer starken Bande traten stets zwei schwache Schatten auf. Weitere Versuche mit absolut reinem Enzym sind erforderlich, um durch modifizierte Anwendung der beschriebenen Methoden die Untereinheitenstruktur aufzuklären.



Abb. 33: Dodecyl-Sulfat-Gel-Elektrophorese der Chorismat-Mutase.  
A. Mit 1 % SDS und anschließend 2 % Jodacetamid behandeltes Enzym (ca. 250  $\mu$ g). Banden (von oben) Dimer (38 000) und Monomer (20 000).  
B. Perameisensäure oxydiertes Enzym. Ca. 100  $\mu$ g aufgetragen. Banden (von oben) 79 000 (Tetramer), 53 000, 43 000 (Dimer), 20 000 (Monomer).

#### IV. DISKUSSION

=====

##### 1. Kinetik und $p_H$ -Abhängigkeit der Chorismat-Mutase

Viele allosterischen Enzyme weisen eine sigmoidale Substratsättigungskurve auf. Daraus läßt sich entnehmen, daß die ersten Substratmoleküle nur mit geringer Stabilität gebunden werden oder daß bei niederen Substratkonzentrationen die Affinität des Enzyms zum Substrat wenig ausgeprägt ist. Mit

steigender Substratkonzentration wächst die Affinität bis schließlich alle Substratmoleküle mit hoher Stabilität gebunden werden. Es wurde für verschiedene Enzyme gezeigt (z.B. Haemoglobin, Aspartat-Transcarbamylase), daß die einzelnen Bindungsorte soweit voneinander entfernt sind, daß eine direkte Wechselbeziehung zwischen ihnen auszuschließen ist. Aus den experimentellen Daten vor allem der Untersuchungen der Aspartat-Transcarbamylase und Threonin-Deaminase (Gerhart und Pardee 1963 und Changeux 1963) wurden folgende Aussagen abgeleitet: mehrere unbesetzte katalytische Orte innerhalb eines Enzymmoleküls zeigen geringere Substrataffinität als voneinander isolierte katalytische Orte. Steigende Substratkonzentrationen oder positive Effektoren schwächen oder heben die gegenseitige Zwischenwirkung der unbesetzten Bindungsorte auf.

Das Modell von Monod et al. (1965) stellt einen Versuch dar, die beobachtete Kooperativität der Ligandenbindung in Beziehung zur Kooperativität der Makromolekularen Struktur zu setzen. Es wird postuliert, daß ein allosterisches Protein eine geringe Anzahl identischer Untereinheiten (Protomere) besitzt und im Gleichgewicht zwischen einer kleinen Zahl von Konformationszuständen steht, die sich in ihrer Affinität zu den Liganden unterscheiden. Von diesen Zuständen sind die stabilsten und entsprechend bevorzugten jene, in denen alle Protomere des Proteinmoleküls die gleiche Konformation besitzen. Die Kooperativität der Ligandenbindung entsteht aus der koordinierten Umlagerung aller Protomere eines Proteinmoleküls in einen Konformationszustand, der größere Affinität für die Liganden zeigt (R-Zustand). Die Konformationsänderung des Proteins folgt dem Alles- oder Nichts-Gesetz; Hybridformen treten (in nennenswerten Mengen) keine auf. Es besteht keine strikt lineare Abhängigkeit zwischen der Anzahl besetzter Bindungsstellen und der Anzahl Moleküle in einer gegebenen Konformation. Diese Annahme und die, daß das Konformationsgleichgewicht die Bindung von Effektoren begünstigt, unterscheidet das MWC Modell von anderen, in

denen die Konformationsänderung durch Ligandenbindung induziert wird (Koshland et al. 1963). Beide Modelle lassen sich mit drei Parametern beschreiben: Im MWC Modell geben sie die Bindung des Substrats im R und T Zustand und die Isomerisierung der beiden Formen wieder. Bei geeigneter Wahl dieser Größen sind für beide Modelle Bindungskurven errechenbar, die völlig identisch mit den experimentell ermittelten sind.

In der Arbeitsgruppe von Eigen in Göttingen gelang es K. Kirchner (1966) durch Relaxationsmessung nachzuweisen, daß für die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase der MWC Mechanismus zutrifft. Untersuchungen der gleichen Arbeitsgruppe am Haemoglobin ergaben, daß hier das von Koshland et al. (1963) erarbeitete Modell dem Reaktionsablauf entspricht. Die zwei Modelle scheinen die beiden Grenzfälle eines allgemeineren Grundschemas darzustellen (Eigen 1967, 1968). Sie stimmen in den Aussagen weitgehend überein, beziehen aber sehr verschiedene Ausgangspunkte.

Im MWC Modell liegen nur zwei Zustände vor. Substratmoleküle oder der Aktivator können die eine Konformation ohne Zwischenstände in die andere überführen. Für die Kinetik im Bereich der wahren Anfangsgeschwindigkeit ist daraus abzuleiten, daß der Aktivator den R Zustand bedingt. Dabei reagiert nur eine Enzykonformation mit dem Substrat; es liegt also eine Reaktion erster Ordnung vor. Ohne Aktivator können beide Zustände mit dem Substrat reagieren (Reaktion zweiter Ordnung).

Das Koshland Modell (1963) sieht alle möglichen hybriden Formen vor, wobei nur Untereinheiten, die Substrat gebunden haben, einen Einfluß auf die Affinität zum Substrat ausüben. Der Aktivator hat in diesem Modell die gleiche Wirkung wie Substrat: er erleichtert die Substratbindung. Da jedoch nach wie vor eine Vielzahl von Zwischenzuständen mit unterschiedlichen Affinitäten vorliegt, ist eine Kinetik zu erwarten, die sich im Prinzip nicht von der ohne Aktivator unterscheidet (gleiche Ordnung der Reaktion). Schließlich muß noch ein drittes Modell erwähnt werden.

das 1965 von Atkinson et al. auf Grund von Untersuchungen an Phosphofruktokinase und Isocitrat-Dehydrogenase entwickelt wurde. Für die weitere Betrachtung der Chorismat-Mutase kommt es jedoch nicht in Betracht, da weder Zugabe von Aktivator noch Hemmer eine Änderung der Ordnung der Reaktion bewirken würde.

Bei den Untersuchungen der Chorismat-Mutase waren nur Messungen der Bruttogeswindigkeiten der Enzymkatalyse in endlich kleinen Zeitdimensionen (Minuten) möglich. Aus den Resultaten (Abb. 24 und 26) geht hervor, daß Zugabe des Aktivators Tryptophan zu Enzym und Substrat eine Reaktion erster Ordnung bewirkt, während die Enzymkatalyse mit dem Substrat allein bei  $p_H$  8,4 nach einer Reaktion zweiter Ordnung verläuft. Das entspricht genau den Folgerungen, die sich aus dem MWC Modell ableiten lassen: Der Aktivator bedingt die Verschiebung des Gleichgewichts ganz auf die Seite des R Zustandes (höhere Substrataffinität). Ohne Effektor liegt ein Gleichgewicht der beiden Zustände R und T vor, die beide mit dem Substrat reagieren können. Am MWC Modell sollen deshalb auch die weiteren Ergebnisse diskutiert werden.

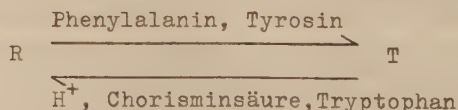
Der Hemmer ist in der Lage, das Gleichgewicht zugunsten des T Zustandes zu verschieben; hohe Substratkonzentrationen begünstigen den R Zustand, sodaß bei geeigneter Wahl der Hemmerkonzentration die Gleichgewichtsverschiebung durch den negativen Effektor mit steigenden Substratmengen kompensiert werden kann (Abb. 27). Eine erhöhte Zwischenwirkung der Substratbindungsorte ist die Folge davon (Abb. 28).

Im Falle der Chorismat-Mutase muß noch auf eine weitere Abhängigkeit hingewiesen werden, die bisher bei allosterischen Enzymen in dieser Deutlichkeit nicht gefunden wurde. Es handelt sich dabei um die  $p_H$ -Abhängigkeit der allosterischen Eigenschaften. Die Substratsättigungskurven zeigen am Neutralpunkt einen kaum feststellbaren und bei  $p_H$  8,4 einen sehr ausgeprägten sigmoidalen Verlauf. Die Hemmbarkeit ist bei  $p_H$  6,0

sehr gering und steigt stetig zum alkalischen hin an (Abb. 21 und 22). Die Aktivität des effektor-freien Enzyms fällt jenseits des  $p_h$ -Optimums, das zwischen 7,0 und 7,5 liegt, zum Alkalischen hin steil ab. Der Aktivator ist nun in der Lage die Effekte, die durch eine niedrige Wasserstoffionenkonzentration hervorgerufen werden, zu egalisieren und eine vom  $p_h$  unabhängige Aktivität (abgesehen vom wenig ausgeprägten  $p_h$  Optimum, Abb. 21) einzustellen.

Auch diese Effekte lassen sich am plausibelsten an Hand des MWC Modells erklären. Je höher die Wasserstoffionenkonzentration ist, desto mehr verschiebt sich das Gleichgewicht der Enzymkonformation zugunsten des R Zustandes. Als Folge davon nehmen sowohl die relative Hemmbarkeit als auch die Aktivierbarkeit des Enzyms stark ab. Im Gegensatz dazu ist bei alkalischem  $p_h$  der T Zustand der Konformation bevorzugt. Es muß jedoch betont werden, daß die beschriebenen Wirkungen als "Minimaleffekte" der Beeinflussung der Chorismat-Mutase durch die Wasserstoffionenkonzentration zu betrachten sind. Die entsprechenden Untersuchungen (Abb. 21 und 22) wurden nämlich bei einer Substratkonzentration durchgeführt, die dem 2.5fachen  $k_m$ -Wert entspricht. Hohe Substratkonzentrationen fördern jedoch, wie wir gesehen haben, eine Verschiebung des Gleichgewichts zugunsten des R-Zustands.

In der Terminologie des MWC-Modells lassen sich die beschriebenen Resultate in folgender Zustandsgleichung zusammenfassen:



Von dem Zusammenspiel der einzelnen Komponenten in diesem System hängt es dabei ab, wie der Zustand des Gleichgewichts liegt und welche regulatorischen Eigenschaften dem Enzym daraus zukommen.

## 2. Zur Struktur des Enzyms

Ein Unterschied im Sedimentationsverhalten der Chorismat-Mutase im Saccharose-Dichte-Gradienten mit und ohne Effektor bei verschiedenen  $p_h$  Werten konnte nicht gefunden werden. R und T Zustand des Enzyms unterschieden sich also in ihrem Sedimentationswert nur geringfügig oder überhaupt nicht. Es muß jedoch erwähnt werden, daß sich mit Hilfe der Saccharose-Dichte-Gradienten-Zentrifugation allerdings nur relativ große Sedimentationsunterschiede feststellen lassen. Zwischenwirkungen von Untereinheiten, wie sie Gerhart und Pardee (1963) für die Aspartat-Transcarbamylase nachweisen konnten (die Sedimentationsdifferenz betrug nur 5 %) sind mit der Gradientenzentrifugation nicht feststellbar.

Um trotzdem etwas über Zwischenwirkungen bei der Bindung von Effektoren und über die Identität der Bindungsorte für Phenylalanin und Tyrosin zu erfahren, wurden kinetische Untersuchungen herangezogen. Der  $n'$  von 1,2 kann als Hinweis für das Fehlen einer ausgeprägten Zwischenwirkung der Hemmerbindung gewertet werden. Versuche über die Titration der Aufhebbarkeit der Hemmwirkung der negativen Effektoren durch Tryptophan gaben Aufschluß, ob die Hemmer am gleichen oder an verschiedenen Orten am Enzymprotein gebunden werden. Werden sie am gleichen Ort gebunden, so gibt es wiederum zwei Möglichkeiten, nämlich Bindung mit gleicher und Bindung mit unterschiedlicher Affinität. Im ersten Fall bewirkt sie gleiche Effektivität und gegenseitige Ersetzbarkeit, im zweiten Fall unterschiedliche Wirksamkeit der Hemmer. Mit keiner der Alternativen lassen sich jedoch die folgenden Ergebnisse erklären (Abb. 12). Setzt man in die Enzymteste von beiden negativen Effektoren je die halbe Konzentration der Hemmermengen der Kontrollteste (im einen  $10^{-3} \text{ m}$  L-Tyrosin, im anderen  $10^{-3} \text{ m}$  L-Phenylalanin) ein und stellt die Tryptophankonzentration fest, die notwendig ist, diese Hemmung aufzuheben, so benötigt man die 10 - 20fache Aktivatorkonzentration, die zur Beseitigung der Hemmwirkung der doppelten Phenylalanin- bzw. Tyrosinkonzentration als alleiniger Hemmer notwendig ist. Dieses Verhalten läßt sich nur durch für jeden Hemmer spezifische Bindungsorte erklären.

Die Versuche mit p-Chloromercuribenzoat ergaben, daß SH-Gruppen weder am katalytischen, noch an den regulatorischen Orten eine entscheidende Rolle für deren Funktionen spielen. Untersuchungen zur Untereinheitenstruktur zeigten, daß durch Inkubation des Enzyms in Gegenwart von 1 %igem Dodecylsulfat über 3 Stunden bei 37° eine weitgehendere Dissoziation erfolgt als bei Oxydation durch Perameisensäure und anschließender Dialyse gegen 0.1 % der Detergenskonzentration. Der Grad der Aufspaltung hängt also weitgehend von der Detergenskonzentration ab.

Weitere Aufschlüsse über das Enzym, seinen Aufbau und seine Konfiguration können folgende Versuche ergeben: Inkubation des Enzyms in niedermolarem Harnstoff über verschiedene Zeiten und bei verschiedenen  $p_H$  Werten und anschließende Zugabe der verschiedenen Effektoren und des Substrats. Bewirken nämlich die negativen Effektoren (oder alkalischer  $p_H$ ) eine kompaktere Enzymkonfiguration, so ist eine Reversion des Harnstoffeffekts zu erwarten. Verschiebt der Aktivator oder neutraler  $p_H$  das Zustandsgleichgewicht zugunsten einer stärker aufgefalteten Form, so kann eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Harnstoff angenommen werden. Über die Bestimmung des Partialvolumens mit Hilfe eines Digitometers läßt sich direkt nachweisen, ob bei den verschiedenen  $p_H$  Werten bzw. bei Anwesenheit des positiven oder der negativen Effektoren verschiedene spezifische Gewichte und damit verschiedene Konformationen des Enzyms vorliegen. Eine genaue Bestimmung der Sedimentationskonstanten und des Molekulargewichts in der analytischen Ultrazentrifuge ist notwendig, um die Untereinheitenstruktur mit Hilfe der Aminosäurezusammensetzung und der Kartierung tryptischer Peptide zu klären. Durch die Anlagerung radioaktiv markierter Effektoren an das Enzym läßt sich die Anzahl der entsprechenden Bindungs-orte ermitteln.

### 3. Vergleich der Chorismat-Mutase von Euglena mit der anderer Organismen

Nach der Entdeckung und Identifizierung der Chorisminsäure durch Gibson (1964) setzten zahlreiche Untersuchungen an verschiedenen Organismen über die Regulation der Chorismat-Mutase ein. *Aerobacter aerogenes* (Cotton und Gibson 1965) und *E. coli* (Pittard und Wallace 1966) besitzen zwei durch Chromatographie auf DEAE Cellulose trennbare Formen, von denen eine mit Prephenat-Dehydrogenase Aktivität (T-Protein), die andere mit Prephenat-Dehydratase Aktivität assoziiert ist (P-Protein). Im T-Proteinaggregat wird allein die Dehydrogenaseaktivität, nicht aber die Chorismat-Mutase Aktivität durch Tyrosin gehemmt. Im P-Protein von *A. aerogenosa* werden die Dehydratase Aktivität und die Chorismat-Mutase Aktivität durch Phenylalanin negativ beeinflusst. Eine Mutation bedingt bei *Aerobacter* den Ausfall eines ganzen Proteinkomplexes während bei *E. coli* eine Mutante gefunden wurde, die beide Chorismat-Mutasen besitzt, jedoch keine Prephenat-Dehydratase Aktivität zeigt. Das T-Protein von *A. aerogenes* wurde hoch angereichert (Gibson 1968); es kann in zwei Untereinheiten gespalten werden, die beide enzymatisch inaktiv sind (Cotton und Gibson 1967, 1968).

In einem Stamm von *B. subtilis* (Lorence und Nester 1967) konnten verschiedene Chorismat-Mutasen durch Chromatographie auf DEAE-Cellulose nachgewiesen werden ( $CM_1$ ,  $CM_2$ ,  $CM_3$ ). Die Autoren vermuten, daß  $CM_2$  einen anderen Aggregationszustand von  $CM_1$  darstellt und beide aus den gleichen Untereinheiten aufgebaut sind.  $CM_1$  und  $CM_3$  unterschieden sich in einer Anzahl physikalischer Daten. In einem anderen Stamm von *B. subtilis* wurde nur  $CM_3$  Aktivität gefunden. Keine der aromatischen Aminosäuren übt eine Wirkung auf die Aktivität von  $CM_1$  ( $CM_2$ ) oder  $CM_3$  aus. Es wurden keine Hinweise für die Assoziation mit den Enzymen der Phenylalanin- oder Tyrosinbiosynthese gefunden. Jedoch bildet die Chorismat-Mutase mit DAHP-Synthetase und wahrscheinlich auch mit Shikimat-Kinase

ein Aggregat. Bei *Euglena* konnten wir keine solche Assoziation weder mit DAHP-Synthetase; noch mit Prephenat-Dehydrogenase, Prephenat-Dehydratase, oder Anthranilat-Synthetase finden.

In *Neurospora crassa* kann die Aktivität von Chorismat-Mutase durch Phenylalanin und Tyrosin gehemmt werden (Baker 1966). Der Autor gibt nur die Hemmdaten für  $3 \times 10^{-4}$  molare Konzentration des negativen Effektors an (durch L-Tyrosin 87 % und L-Phenylalanin 65 % Hemmung). Es wurde nicht nachgeprüft, ob additive Hemmeffekte vorliegen. Tryptophan wirkt aktivierend und vermag die Hemmung aufzuheben, jedoch geht aus den Daten in Baker Arbeit hervor, daß verglichen mit der Hemmerkonzentration fast die doppelte Konzentration an Aktivator verwendet wurde. Dieser Effekt könnte sich deshalb auch über eine kompetitive Wirkung des Tryptophans erklären lassen. Im Falle der *Euglena* Chorismat-Mutase genügte im Gegensatz dazu bereits 1/100 der Hemmermenge an Tryptophan, um die Hemmwirkung vollständig aufzuheben. Die maximale Anreicherung, die Baker mit seinem Enzym erreichte, war etwa fünffach. Biochemische Beweise, daß es sich bei der Chorismat-Mutase von *Neurospora crassa* um ein einziges Protein und nicht um Isoenzyme handelt, fehlen. Die kinetischen Daten, die mit kaum angereichertem Enzym erhalten wurden, besagen zwar, daß es sich um ein allosterisches Protein vom K-Typ handelt, jedoch läßt sich aus den Hill-Plots mit  $n = 1,6$  ohne Effektor und  $n = 1,4$  mit Tryptophan (sigmoidale Substratsättigungskurve bei den gegebenen Versuchsbedingungen wenig oder gar nichts für den Mechanismus des Aktivators ableiten. Es wurde nicht geprüft, ob die Hemmerwirkung kompetitiv durch Substrat beseitigt werden kann.

Die Untersuchungen bei *Saccharomyces cerevisiae* (Lingens et al. 1966, 1967) erbrachten Hinweise, daß bei diesem Organismus wahrscheinlich Isozyme vorliegen. Beide Chorismat-Mutasen scheinen durch Tyrosin hemmbar zu sein. Die Hemmung kann durch Tryptophan, das als Aktivator der Enzymaktivität wirkt, aufgehoben werden. Das Enzym wurde etwa 30fach angereichert. Bei Chromatographie auf DEAE-Cellulose ergaben sich zwei knapp

nebeneinanderliegende Peaks, deren Aktivitäten durch Tyrosin unterschiedlich hemmbar waren. Außer einer Substratsättigungskurve liegen keine kinetischen Daten vor. Sie wurde mit vermutlich 3 - 4fach angereichertem Enzym erhalten und zeigt einen sigmoidalen Verlauf (K-System). Bei Gegenwart von Tryptophan ist der Sättigungsbereich in Richtung geringerer Substratkonzentrationen verschoben. Durch Wärmebehandlung (7 Min. bei 45°C) verändertes Enzym zeigt die gleiche Kinetik wie ein unbehandeltes Enzym in Gegenwart von Tryptophan und ist nicht mehr durch Tyrosin hemmbar.

Auch der Mutterkornpilz *Claviceps paspali* scheint zwei Chorismat-Mutasen (Lingens et al. 1967) zu besitzen. Im Rohextrakt lassen sich keine Hemmeffekte durch Tyrosin und Phenylalanin nachweisen. Nach der Ammonsulfatfällung ist nur geringfügige Hemmung durch L-Tyrosin (maximal 20 %) und keine Aktivierung durch Tryptophan feststellbar. Nach Chromatographie des Rohextrakts auf DEAE-Cellulose zeigte sich ein kleiner, nicht hemmbarer Vorpeak und ein großer Gipfel; die Enzymaktivität des Hauptpeaks war sowohl durch L-Tyrosin ( $2 \times 10^{-3} \text{ M}$ : 70 %) als auch durch L-Phenylalanin ( $2 \times 10^{-3} \text{ M}$ : 80 %) hemmbar. Durch Tryptophan sind die Hemmwirkungen vollständig aufhebbar. Die Substratsättigungskurve nach der Ammonsulfatfällung folgt einer Henry-Michaelis Kinetik, während die der 200fach angereicherten Präparation einen sigmoidalen Verlauf zeigt (K-Typ Enzym). Zugabe von Tryptophan hat eine Michaelis Sättigungskurve zur Folge. Durch Hitzebehandlung wird das Enzym inaktiviert. Weitere Angaben über die Chorismat-Mutasen bei *Claviceps paspali* liegen augenblicklich nicht vor. Äußerst erstaunlich ist das grundlegend unterschiedliche Verhalten der Chorismat-Mutasen im wenig- und im stärker angereicherten Zustand. Die Möglichkeit, während der Anreicherung die Eigenschaften des Enzyms grundlegend beeinflusst zu haben, kann nicht ausgeschlossen werden. Da keine Konzentrationsabhängigkeiten der Wirkung der Effektoren angegeben werden und die beobachteten Wirkungen auf die Enzymaktivität bei  $2 \times 10^{-3} \text{ M}$  L-Tyrosin-, Phenylalanin- bzw. Tryptophankonzentration gemessen wurden, ist eine Aussage über

die Spezifität dieser Regulation und ihre Rolle im physiologischen System kaum möglich.

Eine kurze Mitteilung liegt auch über die Chorismat Mutase bei *Pisum sativum* vor (Cotton und Gibson 1968). Das Enzym ist im Rohextrakt durch Phenylalanin und Tyrosin hemmbar. Allerdings wurden dazu Effektor-Konzentrationen von  $10^{-3}$  m und höher verwendet. Tryptophan in  $10^{-4}$  m Konzentration bewirkt eine Aktivitätssteigerung um etwa 20 %. Nach Chromatographie auf DEAE-Cellulose erschien ein Peak, der nur noch 17 % der auf die Säule aufgesetzten Aktivität besaß. Das Enzym war nach dieser Behandlung nicht mehr hemmbar. Tryptophan bewirkte eine Aktivitätssteigerung (Rekonstitution) bis zu 50 % der Ausgangsaktivität.

Am besten untersucht wurde bisher das Chorismat-Mutase-Prephenat-Dehydratase Enzym oder der entsprechende Enzymkomplex (die Frage ist noch nicht geklärt) von *Salmonella thyphimurium* (Schmit und Zalkin 1969). Bei diesem Organismus liegt auch ein Enzym oder Enzymkomplex mit Chorismat Mutase-Prephenat Dehydrogenase-Aktivität vor (Dayan und Sprinson 1968). Die Daten aus der Arbeit von Schmit und Zalkin, die an Hand einer etwa 60fach angereicherten Chorismat-Mutase erarbeitet wurden, ergeben folgendes Bild: Phenylalanin, der alleinige Effektor ist ein partiell kompetitiver Hemmer; bei höheren Hemmerkonzentrationen wird der kompetitive Effekt verstärkt. Aus einem  $n'$  von 2,0 für die Wirkung von Phenylalanin wird eine kooperative Zwischenwirkung für mindestens zwei Phenylalanin-Bindungsstellen abgeleitet. Die Kinetik für die Substrat-Sättigung (Michaelis-Verlauf, Gerade in Lineweaver-Burk-Darstellung) und der Hill-Plot von  $n = 1,1$  lassen keine Aussage über Zwischenwirkungen von Substratbindungsstellen zu. Mit  $2,4 \times 10^{-4}$  m Phenylalanin entsteht eine sigmoidale Substratsättigungskurve. Der daraus abgeleitete Hill Koeffizient mit  $n = 2,0$  wird von Schmit und Zalkin als Indiz für eine kooperative Zwischenwirkung von mindestens zwei Substratbindungsstellen gewertet. Wie durch Saccharose-Dichte-

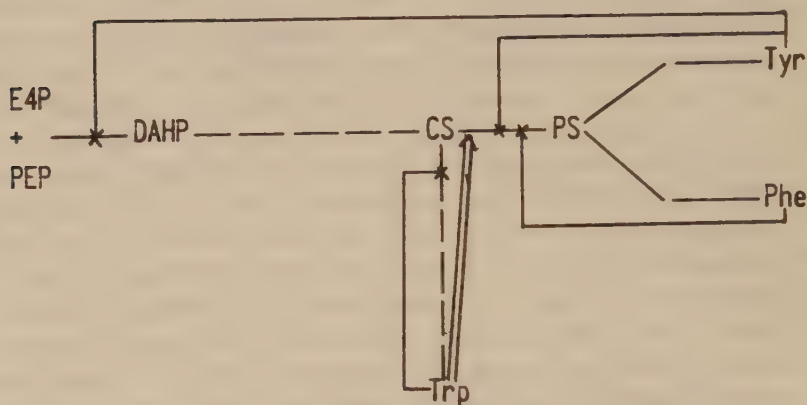
Gradientenzentrifugation nachgewiesen werden konnte, verursacht Phenylalanin eine Konformations- oder Aggregationsveränderung. Das Enzym besitzt keinen Aktivator.

#### 4. Regulation der Biosynthese der aromatischen Aminosäuren bei Euglena, Blau- und Grünalgen

Das klarste Bild der Regulation dieses Biosynthesewegs wurde bei Euglena gewonnen. Mit hoher Wahrscheinlichkeit liegt nur eine DAHP-Synthetase vor, die hauptsächlich durch L-Tyrosin reguliert wird. Tryptophan übt keinerlei Einfluß auf die Aktivität dieses Enzyms aus, bedingt aber selbst bei Anwesenheit der beiden Hemmer Tyrosin und Phenylalanin eine Aktivierung der Chorismat Mutase. Daneben reguliert Tryptophan auch noch die Aktivität der Anthranilat-Synthetase. Diese Aminosäure spielt also eine Schlüsselrolle: ist sie in ausreichender Konzentration vorhanden, so wird seine eigene Biosynthese gehemmt und der ganze Kohlenstofffluß über die Chorismat-Mutase in die Biosynthese von Phenylalanin und Tyrosin gelenkt. Diese beiden Aminosäuren hemmen wiederum die Chorismat-Mutase Aktivität, doch Tryptophan kann bei Erreichen einer bestimmten Konzentration diese Hemmung aufheben; indirekt gesteuert durch den Tryptophanbedarf reguliert schließlich die Tyrosinkonzentration die DAHP-Synthetase Aktivität, und damit die Menge an Kohlenstoff, die in den Biosyntheseweg eingeschleust wird. Ist der Pool an Tryptophan zu niedrig, so können Tyrosin und Phenylalanin die Chorismat-Mutase hemmen und den ganzen Kohlenstofffluß in die Biosynthese des Tryptophans lenken. Eine Aggregation der Schlüsselenzyme kann ausgeschlossen werden. Der beschriebene Regulationsmechanismus wurde bisher bei keinem Organismus gefunden.

Die Chorismat-Mutase der Grünalgen Ankistrodesmus sp., Zygnema sp. und Chlamydomonas reinhardtii zeigen die gleichen allosterischen Eigenschaften wie das Euglena Enzym. Der Befund, daß bei

Ankistrodesmus und Maesotaenium keine in vitro Regulation der DAHP-Synthetase gefunden werden konnte, läßt sich mit der Regulierbarkeit der Chorismat-Mutase in diesen Organismen nicht in Einklang bringen.



Regulationsschema der aromatischen Aminosäurebiosynthese bei *Euglena gracilis* ————— x Hemmung =====> Aktivierung

Unter bestimmten Wachstumsbedingungen, nämlich bei Tryptophan-Überschuß, mußte sich dies in einer Überproduktion von Tyrosin und Phenylalanin auswirken. Eine zweite Interpretationsmöglichkeit wäre die, daß die DAHP-Synthetase dieser Organismen zwar in vivo reguliert wird, daß das Enzym aber während der Extraktbereitung desensitiviert wird und nicht mehr auf die Effektoren anspricht.

Die Blaualge *Anacystis nidulans* zeigt ein dem von *Euglena* ähnliches, jedoch einfacheres Regulationsmuster. Die Chorismat-Mutase wird in "in vitro" Experimenten durch keine der aromatischen Aminosäuren, weder alleine noch in Kombination miteinander, in ihrer Aktivität beeinflußt. Tryptophan jedoch hemmt sehr effektiv die Antranilat-Synthetase. Es fehlt also der bei *Euglena* beschriebene indirekte Rückkopplungsmechanismus. Trotzdem werden bevorzugt jene Endprodukte (Tyrosin und Phenylalanin) synthetisiert, die das erste Enzym des Biosynthesewegs hemmen können.

Ein sehr interessanter Regulationsmechanismus wurde von Nester und Jensen (1966) bei *Bacillus subtilis* entdeckt. Es liegt, wie bei *Euglena*, nur eine DAHP-Synthetase vor, die durch die Intermediärprodukte der Verzweigungsstellen, nämlich Prephenat und Chorismat gehemmt wird. Tyrosin hemmt die Prephenat-Dehydrogenase, Phenylalanin (und Tryptophan) die Prephenat-Dehydratase, sodaß Prephenat und Chorismat akkumuliert werden. Dagegen haben diese Endprodukte des Biosynthesewegs keinerlei Einfluß auf die Aktivität der Chorismat-Mutase. Einige Evidenzen weisen darauf hin, daß eine Assoziation zwischen der DAHP-Synthetase, der Chorismat Mutase und der Shikimat Kinase vorliegt. Die Autoren diskutieren die Möglichkeit, daß der Substrat- bzw. Produktort der Chorismat-Mutase möglicherweise dem regulatorischen Ort für die Hemmung der Shikimat-Kinase und DAHP-Synthetase entspricht.

Bei zahlreichen anderen Organismen gibt es Hinweise für das Vorliegen von Isoenzymen der DAHP-Synthetase (z.B. Jensen et al. 1968, Jensen et al. 1967), wobei für *E. coli* und *A. aerogenes* die gründlichsten Untersuchungen vorliegen. Bei beiden Organismen liegen drei Isoenzyme vor: eines ist durch Phenylalanin, das andere durch Tyrosin und das dritte durch Tryptophan (entgegen früheren Untersuchungen auch bei *E.coli*: Doy 1967) hemmbar und reprimierbar (Ravel et al. 1962, Doy u. Brown 1965,

Wallace u. Pittard 1967 a und b). *Saccharomyces* scheint zwei Isozyme der DAHP-Synthetase (Doy 1968) zu besitzen, die durch Phenylalanin bzw. Tyrosin gehemmt werden. Alle untersuchten DAHP-Synthetasen mit Ausnahme der von *Neurospora crassa* (Doy 1967), also auch die von *Euglena* und den getesteten Blaualgen, gehören dem V-Typ der allosterischen Proteine an.

Diese Aufzählung ist keineswegs vollständig und soll nur einige typische Regulationsmuster bei anderen Organismen zeigen. Die bei *Euglena*, den Blau- und Grünalgen erzielten Ergebnisse beruhen dabei, wie bei den anderen untersuchten Organismen, auf in vitro Untersuchungen und sind daher nur mit den entsprechenden Einschränkungen gültig.

## V. ZUSAMMENFASSUNG

=====

1. Die Substrate Erythrose-4-Phosphat, Chorisminsäure und Prephensäure wurden dargestellt.
2. Es konnte bei Blau- und Grünalgen nachgewiesen werden, daß die Biosynthese der aromatischen Aminosäuren nach dem bei Bakterien, Pilzen und Hefen gefundenen Schema abläuft.
3. Die DAHP-Synthetase der untersuchten Blaualgen wird durch L-Tyrosin und L-Phenylalanin reguliert, wobei L-Tyrosin 100 mal wirksamer ist als L-Phenylalanin (siehe 6.).
4. Bei den Blaualgen *Anabaena* und *Anacystis* wurde gezeigt, daß die DAHP-Synthetase dem V-Typ der allosterischen Proteine angehört.
5. Die Grünalgen *Ankistrodesmus* und *Maesotaenium* zeigten zwar DAHP-Synthetase Aktivität, doch konnte keine Regulation nachgewiesen werden.
6. *Euglena* zeigt, unabhängig von autotropher oder mixotropher Anzucht, eine sehr effektive Kontrolle des ersten Schlüsselenzyms. Die Hemmer sind wiederum Tyrosin und Phenylalanin.
7. Die Wirkung des Phenylalanins beruht auf einer geringen sterischen Spezifität der DAHP-Synthetase für den Hemmer L-Tyrosin.
8. Durch Chromatographie auf DEAE-Cellulose, Gelfiltration auf Sephadex G 200 und nicht additive Hemmeffekte konnten Isoenzyme für die DAHP-Synthetase ausgeschlossen werden.
9. Eine Regulation der Enzymsynthese konnte weder bei *Euglena* noch bei *Anacystis* nachgewiesen werden.
10. Um diese Frage weiter zu verfolgen, wurde erstmals eine Methode zur Herstellung und Isolierung auxotropher coccaler Grünalgen entwickelt.
11. Alle isolierten Mutanten sind entweder Argenin oder Argenin + Histidin auxotroph.

12. Vertreter von 4 Grünalgenordnungen wurden auf die Regulierbarkeit der Chorismat Mutase (2.Schlüsselenzym) untersucht. Alle zeigten das gleiche Regulationsmuster.
13. Die Aktivität der Chorismat Mutase wird durch L-Tyrosin und L-Phenylalanin stark gehemmt.
14. Tryptophan bewirkte bei allen untersuchten Grünalgen eine Aufhebung der Feedbackhemmung durch die negativen Effektoren.
15. Bei der Blaualge *Anacystis nidulans* zeigte keine der aromatischen Aminosäuren einen Einfluß auf die Aktivität der Chorismat Mutase.
16. Alle untersuchten Organismen, sowohl Grün- wie Blaualgen, zeigten eine signifikante Hemmung der Anthranilat Synthetase Aktivität durch L-Tryptophan.
17. Die Chorismat Mutase von *Euglena* wurde 2930fach angereichert im Polyacrylamidgel als einzige Bande nachgewiesen und so Isozyme ausgeschlossen. Mit dieser Präparation wurden kinetische Versuche durchgeführt.
18. Das Substratsättigungsverhalten und die allosterischen Eigenschaften sind von der Wasserstoffionenkonzentration abhängig.
19. Nach der Hill Gleichung ergibt sich bei  $p_h$  8,4 ein  $n = 2$ , für die Reaktion mit dem Substrat, es liegen zwei Enzymkonformationen (R und T) als Reaktionspartner vor.
20. In Anwesenheit von Tryptophan läuft der enzymatische Umsatz nach einer Reaktion erster Ordnung ab  $n = 1,0$ . Es reagiert nur eine Enzymkonformation.
21. Es sind mindestens zwei Substratbindungsorte vorhanden.
22. Jeder negative Effektor hat einen spezifischen Bindungsstelle.
23. Der Grad der Zwischenwirkung bei der Bindung von Tyrosin oder Phenylalanin ist sehr gering bzw. 0.
24. Das Molekulargewicht beträgt unabhängig vom  $p_h$  sowohl bei Chromatographie auf Sephadex Gel G 200 wie auch im Saccharose Dichte Gradienten 160 000.

25. Die Sedimentationsgeschwindigkeit im Saccharose-Dichte-Gradienten ist durch die drei Effektoren nicht beeinflus-  
bar.
26. Weder für die katalytischen, noch allosterischen Eigen-  
schaften, noch die Konfiguration spielen SH-Gruppen eine  
wesentliche Rolle.
27. Die kleinste und hauptsächliche Untereinheit des Enzyms  
hat ein Molekulargewicht von 20 000.

# VI. LITERATURVERZEICHNIS

=====

- AMES, B.N., R.G. MARTIN, b.J. GARRY: J.Biol.Chem. 236, (1961) 2019
- ANDERSON, P.M., S.V. MARVIN: Biochem.Biophys.Res.Com. 32, (1968) 928
- ANDREWS, A.: Biochem.J. 96, (1964) 595
- ATKINSON, D.E., J.A. HATHAWAY, E.C. SMITH: J.Biol.Chem. 240, (1965) 2882
- BAKER, T.J.: Biochemistry 5, (1966) 2654
- BAKER, T.J.: Genetics 58, (1968) 351
- BALLOU, C.E. In: Methods in Enzymology 6, S.P. COLOWICK und N.O. KAPLAN, ed., S 482 Academic Press, New York 1963
- BÖCK, A.: Arch.Mikrobiol. 68, (1969) 165
- BURGES, R.R.: J.Biol.Chem. 244, (1969) 6168
- CASKEY, T.C., ASHTON, D.M., J.B. WYNGAARDEN: J.Biol.Chem. 239 (1964) 2570
- CHANGEUX, J.-P.: Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol. 28, (1963) 497
- CHANGEUX, J.-P., M.M. RUBIN: Biochemistry 7, (1968) 553
- CHRAMBACH, A., R.A. REISFELD, M. WYCKOFF, J. ZACCARI: Analyt. Biochem. 20, (1967) 150
- COTTON, R.J.H., F. GIBSON: Biochim.Biophys.Acta 100, (1965) " " " " 147, (1967) " " " " 156, (1968) " " " " 160, (1968)
- COX, G.B., F.GIBSON: Biochim.Biophys.Acta 93, (1966) 204
- DATTA, P., H.GEST: Proc.Natl.Acad.Sci. 52, (1964) 1004
- DAYAN, J., D.B.SPRINSON: Fed.Proc. 27, (1968) 290
- DOY, C.H., K.D.BROWN: Biochim.Biophys.Acta 104, (1965) 377

- DOY, C.H.: Biochem.Biophys.Res.Com. 26, (1967) 187
- DOY, C.H.: Biochim.Biophys.Acta 151, (1968) 293
- DOY, C.H.: Biochim.Biophys.Acta 159, (1968) 352
- EDWARDS, J.M., F.GIBSON, L.M.JACKMAN, S.H.SHANNON: Biochim.  
Biophys.Acta 93, (1964) 78
- EIDLIC, L., F.C.NEIDHARDT: Proc.Natl.Acad.Sci. 53, (1965) 539
- EIGEN, M.: Angew. Chem. 80, (1968) 892
- EISENSTADT, J.M., G.BRAWERMAN: J.Mol.Biol. 10, (1964) 392
- EISENSTADT, J.M., G.BRAWERMAN: Biochim.Biophys.Acta 80, (1964)  
463
- EHRENSTEIN, G., F.LIPMAN: Proc.Natl.Acad.Sci. 47, (1961) 941
- FRAENKEL, D.G., F.C.NEIDHARDT: Biochim.Biophys.Acta 53, (1961)  
96
- GERHART, J.C., A.B.PARDEE: Fed.Proc. 20, (1961) 244
- GERHART, J.C., A.B.PARDEE, Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol.  
28, (1963) 491
- GERHART, J.C., H.W.SCHACHMAN: Biochemistry 4, (1965) 1054
- GIBSON, M.J., F.GIBSON: Biochim. Biophys.Acta 65, (1962) 160
- GIBSON, M.J., F.GIBSON: Biochem.J. 90, (1964) 248
- GIBSON, F.: Biochem. J. 90 (1964) 256
- GIBSON, F., J.PITTARD, (R.G.H.COTTON): Bact.Review 32, (1968)  
465
- JACOBY, W.B.: J.Biol.Chem. 207, (1954) 657
- JENSEN, R.A., E.W.NESTER: J.Biol.Chem. 241, (1966) 3365
- JENSEN, R.A., D.S.NASSER, E.W.NESTER: J.Bact. 94, (1967) 1582
- JENSEN, R.A., D.S.NASSER, E.W.NESTER: J.Bact. 95, (1968) 188
- KAPOOR, M., D.F.BRAY, G.W.WARD: Arch.Biochem..Biophys. 3, (1969)  
810
- KANAREK, L., E.MARLER: J.Biol.Chem. 239, (1964) 4207
- KEILIN, D., E.F.HARTREE: Proc.Roy.Soc. 124, (1938) 397

- KORNBERG, A. In: Methods in Enzymology 1, S.P.COLOWICK und N.O.KAPLAN, ed., S 441 Academic Press, New York 1963
- KIRSCHNER, K., M.EIGEN, R.BITTMANN, B.VOIGT: Proc.Natl.Acad. Sci. 56, (1966) 1661
- KOSHLAND, D.E.: Cold Spring Harbor Symp. Quant.Biol. 28, (1963) 473
- KOSHLAND, D.E.: Fed.Proc. 23, (1964) 719
- KOSHLAND, D.E., G.NEMETHY, D.FILMER: Biochemistry 5, (1966) 365
- KRATZ, W.A., J.MYERS: Amer.J.Bot. 42, (1955) 282
- LEE, N.M., E.M.LANSFORD, W.SHIVE: Biochem.Biophys.Res.Com. 24, (1966) 315
- LEISTNER, E., J.H.SCHMITT, M.H.ZENK: Biochem.Biophys.Res.Com. 28, (1967) 845
- LIN, C.C.E., B.M.PITT, M.CIVEN, E.KNOX: J.Biol.Chem. 233, (1958) 668
- LINGENS, F., W.GOEBEL, H.UESSELER: Biochem.Z. 346, (1966) 357
- LINGENS, F., W.GOEBEL, H.UESSELER: Europ.J.Biochem. 1, (1967) 363
- LINGENS, F.: Angew. Chem. 80, (1968) 384
- LORENCE, J.H., E.W.NESTER: Biochemistry 6, (1966) 1541
- LOWRY, O.H., N.J.ROSENBROUGH, A.L.FARR, R.J.RANDALL: J.Biol. Chem. 193, (1951) 265
- MARTIN, R.G., N.B.AMES: J.Biol.Chem. 236, (1961) 1372
- MAURER, H.R.: Disk Elektrophorese Berlin W. de Gryter u. Co. 1968
- MECKE, D., K.WULFF, H.HOLZER: Biochim.Biophys.Acta 128, (1966) 559
- METZENBERG, R.L., H.K.MITCHEL: Arch.Biochem.Biophys. 64, (1956) 51

- MONOD, J., F.JACOB: Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol. 26,  
(1961) 389
- MONOD, J., J.WYMAN, J.-P.CHANGEUX: J.Mol.Biol. 12, (1965) 88
- NESTER, E.W., R.A.JENSEN: J.Bact. 91, (1966) 1594
- OHMANN, E.: Biochim.Biophys.Acta 82, (1964) 325
- PAULUS, H., E.J.GRAY: J.Biol.Chem. 239, (1964) 4009
- PHILLIPS, A.T., W.A.WOOD: J.Biol.Chem. 240, (1965) 4703
- PIERARD, A.: Science 154, (1966) 1572
- PITTARD, J., B.J.WALLACE: J.Bact. 91, (1966) 1494
- PRINGSHEIM, E.G.: Arch.Mikrobiol. 63, (1968) 1
- RAVEL, J.M., S.R.LAX, W.SHIVE: J.Biol.Chem. 237, (1962) 237
- RAWSON, J.R., E.STUTZ: Biochim.Biophys.Acta 190, (1969) 368
- ROSENBLOOM, J., E.SUGIMOTO, L.PIVER: J.Biol.Chem. 243, (1968) 2099
- ROTH, J., D.N.ANTON, P.E.HARTMANN: J.Mol.Biol. 22, (1966) 305
- ROTH, J., B.N.AMES: J.Mol.Biol. 22, (1966) 325
- RUPPEL, H.G.: Flora (Jena) 152, (1962) 113
- SANWAL, B.D., M.W.ZINK, C.S.STACHOW: Biochem.Biophys.Res.Com.  
12, (1963) 510
- SANWAL, B.D., P.MAEBA: J.Biol.Chem. 241, (1966) 4557
- SCHLESINGER, S., B.MAGASANIK: J.Mol.Biol. 9, (1964) 670
- SCHMIT, J.C., H.ZALKIN: Biochemistry 8, (1969) 174
- SCHWINK, J., E.ADAMS: Biochim. Biophys.Acta 36, (1959) 102
- SILBERT, D.F., G.R.FINK, B.N.AMES: J.Mol.Biol. 22, (1966) 335
- SINGH, R.N., H.N.SINGH: Arch.Mikrobiol. 48, (1964) 109
- SHAPIRO, A.L., E.VINUELA, J.V.MAIZEL: Biochem.Biophys.Res.Com.  
28, (1967) 815
- SMITH, L.C., J.M.RAVEL, S.R.LAX, W.SHIVE: J.Biol.Chem. 237,  
(1962) 3566
- SOMMERVILLE, R.L., R.ELFORD: Biochem.Biophys.Res.Com. 28,  
(1967) 437

- SPIESS, E., G.RICHTER: Arch.Mikrobiol. 53, (1966) 195
- WADELL, W.J., J.LAB: Clin.Med. 48, (1956) 311
- UMBARGER, H.E.: Ann.Rev.Biochem. 38, (1969) 323
- WALLACE, B.J., J.PITTARD: J.Bact. 93, (1967) 237
- WALLACE, B.J., J.PITTARD: J.Bact. 94, (1967) 1279
- WEBER, H.L., A.BÖCK: Arch.Mikrobiol. 61, (1968) 159
- WEBER, H.L., A.BÖCK: Arch.Mikrobiol. 66, (1969) 250
- WOOLFOLK, C.A., E.R.STADTMAN: Arch.Biochem.Biophys. 118,  
(1967) 736
- ZENK, M.H.: In: Biosynthesis in aromatic compounds.  
Proc. 2nd meeting Fed.Europ.Biochem.Soc.  
Bd. 2 S 45 Oxford: Pergamon Press 1966
- ZARLENGO, M.H., G.W.ROBINSON, R.O.BURNS: J.Biol.Chem. 243,  
(1968) 189
- ZUBAY, G.J.: Mol. Biol. 4, (1962) 347

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Privatdozent Dr.A.Böck durchgeführt.

Ihm gilt mein herzlicher Dank für die aufgeschlossene Atmosphäre in seinem Arbeitskreis, für vielseitige Anregungen und zahlreiche wertvolle Ratschläge, sowie für die ständige hilfsbereite Anteilnahme sowohl an wissenschaftlichen wie auch persönlichen Fragen.

Herrn Prof.Dr.M.H.Zenk von der Ruhruniversität Bochum und seinen Mitarbeitern möchte ich für zahlreiche anregende Diskussionen und praktische Hinweise meinen besonderen Dank aussprechen.

Frl. B.Knabe gilt mein Dank für ihre stete, freundliche Hilfsbereitschaft.

Herrn Liedl möchte ich für die Anfertigung einiger schwieriger Photographien, Frl. Bohm für die Ausführung der Zeichnungen danken.

Die Arbeit wurde durch Sach- und Personalbeihilfen der Deutschen Forschungsgemeinschaft an Herrn Priv. Doz. Dr.A.Böck unterstützt.

## L e b e n s l a u f

Am 3. März 1942 wurde ich, Hermann Lothar Weber, als viertes Kind des Volksschullehrers Friedrich Weber und seiner Frau Karoline, geb. Steinbauer in Griesbach/R.(Ndb.) geboren. Ich besuchte die Volksschulen in Uttlau, St.Salvator und Straubing, trat in die dortige Oberrealschule über und legte 1963 die Reifeprüfung an dieser Schule ab. Im gleichen Jahr wurde ich zur Bundeswehr als Wehrpflichtiger eingezogen und im Oktober des folgenden Jahres entlassen. Im Wintersemester 1964/65 nahm ich das Studium der Fächer Biologie, Chemie und Erdkunde auf. Im März 1967 begann ich im Botanischen Institut der Universität München unter Anleitung von Herrn Dozent Dr.A.Böck mit der vorliegenden Arbeit. Seit August 1967 werde ich aus Mitteln der DFG als wissenschaftliche Hilfskraft bezahlt.

Seit August 1968 bin ich verheiratet.



